

UNIVERSITE D'Auvergne

N° D.U. 1579

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

Année 2005

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre : 422

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE
SPECIALITE : NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS
SOUTENUE LE 6 JUILLET 2005**

Laurence MAUNIER-SIFRE

**ORGANISATION SPATIALE DU TISSU CONJONCTIF
INTRAMUSCULAIRE :
RELATION AVEC LA TEXTURE DE LA VIANDE BOVINE**

Président Jean-Bernard Gros

Rapporteurs Antoine Clinquart
Daniel Herbage
Christophe Odet

Membres Vincent Barra
Joseph Culioli

Unité de recherche Qualité des produits animaux
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand – Theix

A Olivia, Michaël et ma mère

A la mémoire de mon père et de ma grand-mère

*« Si la chance me conduit, je découvrirais où la vérité se cache,
bien qu'elle eût toujours été en pleine lumière. »*

(Tiré d'Hamlet, William Shakespeare)

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	xiii
 INTRODUCTION.....	 1
A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A.1 Tissue conjonctif intramusculaire	5
A.1.1 Organisation du tissu conjonctif dans le muscle	6
A.1.2 Composition du tissu conjonctif intramusculaire.....	12
A.1.3 Implication du tissu conjonctif intramusculaire dans la tendreté de la viande.....	18
A.1.4 Conclusion.....	26
A.2 Analyse d'images	27
A.2.1 Modalités d'imagerie	27
A.2.2 Traitement et analyse d'images.....	30
A.2.3 Analyse d'images appliquée à la caractérisation des viandes	34
A.3 Conclusion.....	35
 B. MATERIELS ET METHODES.....	 37
B.1 Etude préliminaire	38
B.1.1 Echantillons de muscle.....	38
B.1.2 Evaluation de la texture.....	39
B.1.3 Caractérisation du tissu conjonctif	41
B.1.4 Segmentation.....	44
B.1.5 Analyse statistique.....	52
B.2 Organisation spatiale du perimysium et texture de la viande cuite.....	53
B.2.1 Echantillons de muscle.....	53
B.2.2 Evaluation de la texture.....	55
B.2.3 Caractérisation du tissu conjonctif	56
B.2.4 Analyse statistique et modélisation	63
 RESULTATS ET DISCUSSION.....	 67
 C. ETUDE PRELIMINAIRE.....	 69
C.1 Contrôle de l'état de maturation et de contraction	69
C.2 Teneur en collagène	71
C.3 Mesures mécaniques de dureté.....	72
C.3.1 Compression à 80% sur viande crue	72
C.3.2 Pertes à la cuisson et cisaillement sur viande cuite.....	73
C.4 Conclusions	77
C.4.1 Choix des muscles.....	77
C.4.2 Evaluation de la dureté.....	77

D.	L'OUTIL D'ANALYSE D'IMAGE.....	79
D.1	Seuillage par référence à des cartes probabilistes	80
D.2	Validation.....	86
D.2.1	Comparaison à la méthode de Rosin	86
D.2.2	Comparaison à la quantité de collagène	90
D.3	Extraction de primitives	92
D.3.1	Estimation de l'épaisseur	92
D.3.2	Choix des niveaux de segmentation	93
D.3.3	Choix des images en RMN.....	95
D.4	Discussion sur la méthode PMT.....	95
D.4.1	Voies d'amélioration possibles de la méthode	95
D.4.2	Avantages et inconvénients de la méthode	97
D.5	Conclusions et perspectives	99
E.	ORGANISATION SPATIALE DU PERIMYSIUM ET TEXTURE DE LA VIANDE CUITE	101
E.1	Mesures de texture	101
E.1.1	Contrôle des échantillons	101
E.1.2	Compression à 80% de déformation	102
E.1.3	Evaluation sensorielle	104
E.2	Réseau conjonctif	109
E.2.1	Teneur en collagène	109
E.2.2	Teneur en lipides	109
E.2.3	Stabilité thermique du collagène	110
E.2.4	Paramètres d'organisation spatiale du pérимыsium.....	111
E.3	Relation entre la dureté de la viande et les caractéristiques du tissu conjonctif	120
E.3.1	Relation entre mesures de texture et quantité de collagène	120
E.3.2	Modèles construits à partir d'une segmentation au niveau de confiance de $\varepsilon = 80\%$	120
E.4	Modèles construits à partir d'une segmentation au niveau de confiance $\varepsilon = 40\%$	128
E.4.2	Discussion sur les modèles retenus	134
E.5	Conclusions	138
F.	CARTOGRAPHIE DE LA TRAME CONJONCTIVE.....	139
F.1	Localisation des molécules de la matrice extracellulaire	139
F.1.1	Collagène de type I.....	139
F.1.2	Collagène de type IV	143
F.1.3	Collagène de type VI.....	143
F.1.4	Collagène de type XII	143
F.1.5	Collagène de type XIV	144
F.1.6	Elastine	145
F.1.7	Décorine	146
F.1.8	Lipides	147
F.2	Relation entre la composition et dépôt lipidique.....	151
F.3	Conséquences sur l'imagerie IRM pondérée en susceptibilité.....	152
F.4	Conclusion.....	156
	CONCLUSION	157
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159

REMERCIEMENTS

Cette thèse a bénéficié d'un cofinancement des départements CEPIA (Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture) et PHASE (Physiologie animale et systèmes d'élevage) de l'INRA et de la région Auvergne.

Elle s'est réalisée grâce à l'accueil dans l'unité de recherche sur la viande (URV) dirigée par J. Culioli puis l'unité Qualité des produits animaux (QuaPA) dirigée par JP Renou et dans de l'unité de recherche sur les herbivores (URH) dirigée par J.B. Coulon, au sein de l'équipe croissance et métabolisme du muscle (C2M) animée par J.F. Hocquette.

Je remercie Messieurs Clinquart, Herbage et Odet d'avoir bien voulu être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Messieurs Gros et Barra d'avoir accepté d'être membres du jury.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, Joseph Culioli, pour son esprit critique et ses compétences d'analyse et de synthèse scientifiques.

Je tiens à remercier Richard Taylor et Anne Listrat, qui à l'origine de ce projet, ont su me faire confiance pour le mener à bien.

Merci Richard pour votre très grande connaissance de la microscopie et du muscle et pour avoir su recentrer ce travail dans son cadre biologique à chaque fois qu'il le fallait.

Merci Anne pour m'avoir tellement aidée à faire tous ces marquages immunologiques, pour votre large connaissance de la matrice extracellulaire ainsi que pour votre soutien féminin au milieu de tous ces messieurs.

Je voulais remercier Philippe Berge pour avoir lu, relu et re-relu toutes les versions de ma prose et pour m'avoir tant aidée à mettre en place mes idées. Votre côté « avocat du diable » m'a été d'une très grande aide.

La partie analyse d'images ne serait rien sans Jean-Marie Bonny, qui a su faire preuve d'énormément de patience et de pédagogie pour m'initier, moi biologiste, au monde du traitement d'images.

Je veux remercier Roland Labas, pour m'avoir accueillie au sein du groupe Microscopie. Merci pour m'avoir initiée à toutes les techniques d'histologie et merci pour son optimisme permanent.

Merci à Ludivine pour avoir su transformer le labo en oasis tropical et pour m'avoir soutenue tout au long de mon passage.

Je voudrais remercier Jean-Pierre Renou et toute l'équipe STIM, pour m'avoir permis de faire mes acquisitions en IRM.

Je tiens à remercier Bernard Dominguez, Raphaël Favier, Rémi Fournier, Patrick Blinet et Jean-François Chazeix pour leur aide technique à la paillasse et dans les abattoirs.

Merci à Marie-Christine Bayle pour m'avoir fait découvrir l'analyse sensorielle le temps de cette dernière étude.

Je remercie également tous les membres du jury de dégustation pour avoir été si consciencieux. Je peux maintenant le dire « C'était vraiment pas bon ! ».

En ce qui concerne les statistiques, merci à Patrick Gasqui, Jean-François Martin et Erwan Engel de m'avoir consacré un peu de leur temps. J'espère avoir été une élève studieuse.

Egalement merci à tous ceux que j'ai côtoyés quotidiennement au cours de mon séjour à l'INRA et notamment Caroline, Isabelle, Sylvie, Yvette et toute l'équipe BPM.

Enfin merci à Stéphanie et Véronique, adorables compagnons de galère. Qui a dit que la solidarité entre thésards n'existait pas ? Ca y est, on arrive au bout.

Enfin merci à Michaël pour m'avoir soutenue et accompagnée tout au long de ces années de thèse pour le meilleur et pour le pire.

LISTE DES FIGURES

Figure A-1. Organisation des différents niveaux de tissu conjonctif dans le muscle squelettique.....	6
Figure A-2. Photographie en microscopie électronique à balayage de l'endomysium du muscle Sternomandibularis de bovin après extraction des composants myofibrillaires à l'aide de soude (NaOH).....	6
Figure A-3. Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans l'épimysium du muscle Sternomandibularis de bovin. Les lignes horizontales signalent les contours des myofibres à la surface du muscle. Les fibres de collagène de l'épimysium en surépaisseur apparaissent sous la forme de deux trames de fibres parallèles formant un angle d'environ 54° par rapport à la direction des myofibres (Harries et al., 1972). Une structure semblable est retrouvée dans le périmysium.	7
Figure A-4. Périmysium d'un muscle <i>Pectoralis profundus</i> de poulet en microscopie électronique (Nakamura <i>et al.</i> , 2003).....	9
Figure A-5. Caractérisation des différents types de faisceaux à l'intérieur d'un faisceau principal. On peut distinguer ensuite la hiérarchisation des faisceaux selon l'ordre suivant: faisceaux primaires (b), faisceaux secondaires (c), faisceaux tertiaires (d), faisceaux quaternaires (e) et enfin faisceau principal (f).	11
Figure A-6. Coupe musculaire colorée au Rouge Sirius, identifiant ici en noir le tissu conjonctif. On peut remarquer que les fibres musculaires (ici en gris) au bord du faisceau primaire sont alignées.....	12
Figure A-7. Représentation schématique de l'évolution des protéoglycannes dans le muscle bovin durant la maturation <i>post mortem</i> . (Nishimura <i>et al.</i> , 1996).....	24
Figure A-8. De l'acquisition à l'extraction d'indices quantitatifs. D'après Mery et Pedreschi, 2005.....	27
Figure B-1. Photographies de morceaux des six muscles étudiés (environ 2 cm de côté), coupés transversalement par rapport à l'axe des fibres musculaires. Le grain de la viande, dessiné par les faisceaux de fibres musculaires, est fortement dépendant du type de muscle considéré.....	38
Figure B-2. Cellule de compression en configuration longitudinale installée sur une machine d'essais INSTRON 4501	39

Figure B-3. Fibre musculaire striée observée avec un microscope équipé d'un objectif à immersion de grossissement $\times 125$. La distance entre deux bandes sombres successives définit la longueur du sarcomère.	40
Figure B-4. Cellule de cisaillement installée sur une machine d'essais Instron 4501.....	41
Figure B-5. Coupe du muscle Biceps femoris colorée au Rouge Sirius	43
Figure B-6. Banc d'imagerie utilisé pour l'acquisition des images de coupes histologiques de muscle.....	43
Figure B-7. Image en niveaux de gris d'une coupe histologique de muscle Biceps femoris de bovin colorée au rouge Sirius, mettant en évidence le tissu conjonctif et son histogramme unimodal.....	45
Figure B-8. Les différentes étapes de la construction d'une carte de référence probabiliste, de l'image originale (a) à la carte de moyenne pour $N = 20$ juges (c). En (b) on observe le tracé d'un juge. En (d) et (e) les seuillages de la carte de référence à différents niveaux de confiance $\varepsilon = 80\%$ et 40% , respectivement.	48
Figure B-9. Evolution des pourcentages d'erreur totale (E), d'erreur sur les objets (Eoo) et d'erreur sur le fond (Eob), en fonction du niveau de gris de seuillage de l'image traitée. Le minimum global de E correspond à t^* , seuillage optimal de l'image par rapport à la carte de référence correspondante.....	49
Figure B-10. Plan de prélèvement des échantillons selon les types de muscle. A 48 h <i>post mortem</i> , deux cubes de 2 cm d'arête ont été prélevés pour l'histologie. A 21 jours <i>post mortem</i> , un échantillon a été prélevé pour l'imagerie par résonance magnétique, le reste du muscle étant partagé entre les dosages et les mesures de texture.....	54
Figure B-11. Image par résonance magnétique nucléaire de muscle <i>Biceps femoris</i> selon une séquence d'imagerie CSS-IR en mode « water saturated » à 4.7 T. En blanc, apparaît le tissu adipeux et en noir les myofibres.	57
Figure B-12. Image par résonance magnétique nucléaire de muscle <i>Biceps femoris</i> selon une séquence d'imagerie pondérée en susceptibilité magnétique à 4.7 T. En noir, apparaît le tissu conjonctif contenant le tissu adipeux, en gris les myofibres et en blanc l'eau libre.	58
Figure B-13. Exemple d'analyse granulométrique sur une image de coupe histologique du muscle <i>Biceps femoris</i> (BF). A) image histologique originale, b) image histologique segmentée à 80% par la méthode PMT, c) répartition des éléments structurants hexagonaux.	60
Figure B-14. Coupe musculaire colorée au Huile rouge O. Les adipocytes apparaissent en rouge.....	60

Figure B-15. Schéma récapitulant les étapes du traitement statistique mis en œuvre pour étudier les relations entre le tissu conjonctif et la texture de la viande.	66
Figure C-1. Relation entre teneur en collagène et la dureté de la viande crue estimée par la contrainte en compression longitudinale à 80% de déformation.	73
Figure D-1. Carte de référence d'une coupe histologique de muscle, qui fournit la probabilité d'appartenance du pixel à la classe « pérимыsium » et résultats du seuillage pour deux niveaux de confiance $\varepsilon = 80\%$ et 40%	80
Figure D-2. Evolution des erreurs en fonction du seuil pour un seuillage de la carte de référence à 30% (a) et 80% (b). Eoo correspond à l'erreur faite sur le réseau, Eob l'erreur faite sur les fibres et $E = Eoo + Eob$. A 80%, la courbe de E forme un palier plus large qu'à 30%.83	
Figure D-3. Pourcentages d'erreur de segmentation des images histologiques avec la méthode de Rosin (RT) et la méthode PMT. (a) E est la moyenne de Eoo et Eob, (b) Eoo est l'erreur sur le réseau, et (c) Eob est l'erreur sur les fibres.	88
Figure E-4. Comparaison des performances de segmentation entre l'algorithme de Rosin (RT) et la méthode PMT pour $\varepsilon = 60\%$. Image originale (A, méthode PMT(B) et RT (C).	89
Figure D-5. Corrélacion entre la surface de réseau segmentée pour $\varepsilon = 80\%$ et la teneur en collagène dosée sur les coupes musculaires.	91
Figure D-6. Relation entre la mesure de l'épaisseur du pérимыsium entourant les faisceaux secondaires et le rapport surface sur longueur déterminé après une segmentation PMT d'images histologiques	93
Figure D-7. Evolution de la surface de pérимыsium segmenté sur les coupes histologiques en fonction du niveau de confiance pour les différents types de muscles.	94
Figure D-8. Evolution de la surface de pérимыsium segmenté sur les images RMN en fonction du niveau de confiance pour les différents types de muscles.	94
Figure D-9. Mesure de la surface de réseau segmenté par la méthode PMT à 80% en fonction de la localisation de la coupe virtuelle le long de l'échantillon de muscle en IRM.	95
Figure D-10. Amélioration de l'image (A) après une correction du fond par fermeture morphologique sur les images RMN (B). La segmentation avant pré-traitement (C) est beaucoup plus bruitée qu'après pré-traitement (D).	98
Figure E-1. Analyse en composantes principales des descripteurs du profil sensoriel de texture pour les quatre types de muscles bovins (<i>Biceps femoris</i> (BF), <i>Infraspinatus</i> (IS), <i>Longissimus thoracis</i> (LT) et <i>Pectoralis profundus</i> (PP), dans le plan des deux premières composantes principales (F1et F2). Représentation des observations (A) et des variables (B).	107

Figure E-2. Analyse en composantes principales des descripteurs sensoriels du profil de texture des quatre types de muscles bovins, évalués par un jury de dix dégustateurs entraînés et les mesures instrumentales effectuées sur les mêmes échantillons cuits dans les mêmes conditions pendant 30 min à 65°C.	108
Figure E-3. Coupes histologiques des muscles PP (à gauche) et IS (à droite) colorées à l'huile rouge, mettant en évidence les lipides, ici en noir.	110
Figure E-4. Coupes histologiques transversales des quatre types de muscles colorées au Rouge Sirius. Les lignes noires représentent le périnysium alors que les myofibres apparaissent en gris.	112
Figure E-5. Coupes transversales de quatre types de muscles bovins en IRM. Les lignes noires représentent le tissu conjonctif comprenant périnysium et lipides et les myofibres apparaissent en gris. Les taches blanches représentent l'eau libre.....	115
Figure E-6. Exemples de courbes granulométriques obtenues à partir d'une image de muscle <i>Biceps femoris</i> (BF) acquises en histologie et en IRM, segmentée par la méthode PMT à 80%. H ₄₉ est la taille granulométrique la plus grande pour les images histologiques et elle correspond à G13 sur les images RMN.....	118
Figure E-7. Analyse en composantes principales des variables granulométriques issues de la segmentation à 80% des images RMN. On peut observer que les variables consécutives sont très corrélées.....	119
Figure E-8. Répartition des types de muscles selon leur teneur en collagène et leur dureté sur viande cuite.	121
Figure E-9. ANOVAGramme de la contribution du facteur dureté instrumentale (C80cuit) aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 27 variables biochimiques (collagène) et " image". La variance relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$	123
Figure E-10 Répartition des types de muscles selon leur teneur en collagène (concentration d'hydroxyproline) et leur tendreté sensorielle (sans dimension).	124
Figure E-11. ANOVAGramme de la contribution du facteur tendreté sensorielle aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 27 variables biochimiques (collagène) et " image". La variance relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$	125
Figure E-12. ANOVAGramme de la contribution du facteur quantité de collagène aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 26 variables " image". La variance	

relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	127
Figure E-13. ANOVAGramme de la contribution du facteur C80cuit aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables “ image”. La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	129
Figure E-14. ANOVAGramme de la contribution du facteur tendreté aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables “ image”. La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	131
Figure E-15. ANOVAGramme de la contribution du facteur quantité de collagène aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables « image ». La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	133
Figure E-16. Représentation schématique des résultats obtenus après interprétation des modèles d'analyse générale discriminante. Les muscles tendres possèdent plus de petits faisceaux primaires que les muscles durs.....	137
Figure E-17. Profil de répartition des tailles de granulométrie majeures, expliquant les variations de texture.	137
Figure F-1. Marquages immunologiques du collagène de type I au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins au grossissement 225 pour BF et IS et 450 pour LT et PP.	140
Figure F-2. Marquages immunologiques des collagènes de type I, IV et VI au FITC sur des coupes sériées de <i>Biceps femoris</i> (BF) et <i>Infraspinatus</i> (IS) au grossissement $\times 112$. AD pour adipocytes, C pour capillaires et V pour vaisseaux. L'élastine fluoresce naturellement en orange.	141
Figure F-3. Marquages immunologiques du collagène de type XII, de la décorine, de l'élastine et coloration des lipides au Huile rouge sur des coupes sériées de <i>Biceps femoris</i> (BF) et <i>Infraspinatus</i> (IS) au grossissement $\times 112$. Ad pour adipocytes, C pour capillaires et V pour vaisseaux. L'élastine fluoresce naturellement en orange.	142
Figure F-4. Marquages immunologiques du collagène de type XII au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins (<i>Biceps femoris</i> (BF), <i>Infraspinatus</i> (IS), <i>Longissimus thoracis</i> (LT) et <i>Pectoralis profundus</i> (PP) au grossissement $\times 450$	144

Figure F-5. Coupes histologiques sérieées de muscle <i>Pectoralis profundus</i> marquées avec un anticorps FITC contre le collagène de type I (A) et de type XII (B) au grossissement $\times 450$	144
Figure F-6. Marquages immunologiques du collagène de type XIV au FITC sur des coupes transversales des quatre type de muscle bovin au grossissement $\times 450$ pour l'IS et 225 pour les BF, LT et PP.	145
Figure F-7. Marquages immunologiques de la décorine au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins (<i>Biceps femoris</i> (BF), <i>Infraspinatus</i> (IS), <i>Longissimus thoracis</i> (LT) et <i>Pectoralis profundus</i> (PP) au grossissement $\times 225$	147
Figure F-8. Coupes transversales congelées de muscle colorées à l'huile rouge spécifique des lipides (ici en noir signalés par des flèches).....	148
Figure F-9. Reconstruction tridimensionnelle isotrope du tissu adipeux à partir d'images RMN à l'aide d'une séquence CSSIR en mode « water saturated ».	149
Figure F-10. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de <i>Biceps femoris</i> (BF) en imagerie RMN, et trois coupes sérieées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.	154
Figure F-11. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon d' <i>Infraspinatus</i> (IS) en imagerie RMN, et trois coupes sérieées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.	154
Figure F-12. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de <i>Longissimus thoracis</i> (LT) en imagerie RMN, et trois coupes sérieées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.	155
Figure F-13. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de <i>Pectoralis profundus</i> (PP) en imagerie RMN, et trois coupes sérieées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau A-1. Classification de muscles de bovins sur la base de la taille des faisceaux de fibres musculaires et du profil du tissu conjonctif qui les délimitent (d'après Strandine <i>et al.</i> , 1949).....	10
Tableau A-2. Structure et localisation des différents types de collagènes présents dans le muscle squelettique. D'après Nakajima <i>et al.</i> , 1998 et Nishiumi, 1999.* fibril-associated collagen with interrupted triple helix.	15
Tableau A-3. Teneur en élastine de différents muscles bovins. D'après Bendall, 1967.....	16
Tableau A-4. Liste des critères pris en compte dans la méthode de Schmitt et Dumont (1969)	21
Tableau B-1. Récapitulatif des caractéristiques des anticorps primaires utilisés.....	61
Tableau B-2. Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés.	62
Tableau C-1. Contraintes moyennes en compression à 20% de déformation sur des échantillons crus.....	69
Tableau C-2. Longueurs de sarcomères moyennes mesurées en microscopie optique.....	70
Tableau C-3. Mesures de longueur de sarcomères exprimées en μm des différents types de muscles relevées dans la bibliographie.	71
Tableau C-4. Teneurs en collagène mesurées sur les différents types de muscle, exprimées en mg d'hydroxy-proline par g de muscle frais. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).	71
Tableau C-5. Revue bibliographique de la concentration en collagène exprimée en mg d'hydroxy-proline par g de muscle frais	72
Tableau C-6. Contraintes moyennes en compression à 80% de déformation sur viande crue (C80 cru). Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).	72
Tableau C-7. Pertes à la cuisson et mesures mécaniques de dureté en cisaillement après cuisson des échantillons pendant 15 minutes à 65 °C. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$). Les échantillons sont classés par ordre décroissant de force maximale de cisaillement.	74
Tableau C-8. Pertes à la cuisson et mesures mécaniques de dureté en cisaillement après cuisson des échantillons pendant 30 minutes à 65 °C. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$). Les échantillons sont classés par ordre décroissant de force maximale de cisaillement.	74

Tableau C-9. Revue bibliographique de la force de cisaillement mesurée sur viande cuite 70°C à cœur avec une cellule de Warner-Bratzler, exprimée en N, sur différents muscles. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$).....	74
Tableau D-1. Modèles de régression linéaire définissant les règles de seuillage optimal en histologie.....	84
Tableau D-2. Modèles de régression linéaire définissant les règles de seuillage optimal en IRM.	85
Tableau D-3. Valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R) entre la quantité de collagène déterminée sur coupes histologiques et la surface de périnysium segmentée sur les images des mêmes coupes histologiques.....	90
Tableau F-1. Valeurs moyennes et écarts-types de la contrainte à 20% de déformation mesurée sur viande crue et de la longueur des sarcomères des quatre types de muscles. Des lettres différentes dans une colonne indiquent une différence significative entre les moyennes pour $p < 0,05$	102
Tableau E-2. Valeurs moyennes et écarts-types de la contrainte à 80% de déformation sur viande crue et cuite des quatre types de muscles bovins. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).....	103
Tableau E-3. Evolution, au fil des séances d'entraînement, de la liste des descripteurs du profil sensoriel de dégustation de viande bovine cuite sous vide, 30 min à 65°C au bain-marie.	105
Tableau E-4. Valeurs moyennes des descripteurs sensoriels du profil de texture des quatre types de muscles bovins cuits 30 min à 65°C par un jury de dix dégustateurs entraînés sur une échelle de 1 à 10. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).	105
Tableau E-5. Revue bibliographique de trois descripteurs sensoriels (tendreté globale, teneur en résidus en bouche et jutosité) sur quatre types de muscles de bovins. Les valeurs présentées ont été recalculées pour correspondre à notre échelle de notation comprise entre 0 et 10. ...	106
Tableau E-6. Dosage du collagène estimé par la quantité d'hydroxyproline sur les quatre types de muscle. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).....	109
Tableau E-7. Pourcentage de lipides déterminé par spectroscopie infrarouge sur les quatre types de muscle. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).....	110

Tableau E-8. Pourcentage de collagène solubilisé après une cuisson de 30 min à 65°C sur les quatre types de muscle Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).....	111
Tableau E-9. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images de coupes histologiques par la méthode PMT pour le niveau de confiance $\varepsilon = 80\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).....	112
Tableau E-10. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images de coupes histologiques par la méthode PMT pour le niveau de confiance $\varepsilon = 40\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).....	113
Tableau E-11. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images RMN par la méthode PMT avec $\varepsilon = 80\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).	115
Tableau E-12. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images IRM par la méthode PMT, avec $\varepsilon = 40\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).	116
Tableau E-13. Coefficients de détermination (R^2) entre les variables de composition du muscle (collagène, lipides) et la surface de réseau segmenté pour ε égal à 40 et 80% (ns signifie non significatif ; $p > 0,05$).	117
Tableau E-14. Caractéristiques des modèles obtenus en analyse générale discriminante par l'algorithme « best subset », pour prédire la dureté instrumentale (C80cuit) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$	123
Tableau E-15. Caractéristiques du meilleur modèle obtenu en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la tendreté sensorielle des échantillons cuits 30 min à 65°C pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$	126
Tableau E-16. Caractéristiques du meilleur modèle obtenu en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la concentration de collagène des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$	128
Tableau E-17. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire le C80cuit des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	130

Tableau E-18. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la tendreté sensorielle des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	132
Tableau E-19. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la concentration de collagène des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$	133
Tableau F-1. Présence des différents composés de la matrice extracellulaire selon le type de muscle. + peu présent, ++ assez présent, +++ très présent.	150

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en composantes principales
AGD	Analyse générale discriminante
ATP	Adénosine tri-phosphate
BF	<i>Biceps femoris</i>
C20	Contrainte à 20% de déformation
C80	Contrainte à 80% de déformation
CCD	Coupled Charge Device
CSS-IR	Chemical shift selective – Inversion recuperation
DO	Densité optique
E	Erreur totale
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
Eoo	Erreur sur les objets
Eob	Erreur sur le fond
FACIT	Fibril-associated collagen with interrupted triple helix
FCM	Fuzzy c means
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
GAG	Glycoaminoglycanes
Gi	Variable granulométrique en IRM de rayon i
GLM	General linear model
Gly	Glycine
GT	<i>Gastrocnemius</i>
H ₂ O ₂	Eau oxygénée
Hi	Variable granulométrique en histologie de rayon i
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IS	<i>Infraspinatus</i>
It	Nombre d'images tests
J2	2 jours post mortem
k	Aplatissement (pour kurtosis)
kDa	Kilo Dalton
LT	<i>Longissimus thoracis</i>
M	Moyenne

m/v	Masse/volume
MHz	Méga-hertz
MLD	Mean least distance
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Soude
N_{ap}	Nombre d'échantillons dans le groupe apprentissage
NH_4Cl	Chlorure d'ammonium
N_{test}	Nombre d'échantillons dans le groupe test
N_{val}	Nombre d'échantillons dans le groupe validation
OHPro	Hydroxy-proline
PBS	Phosphate buffer saline
PM	<i>Psoas major</i>
PMT	Probabilistic map thresholding
PP	<i>Pectoralis profundus</i>
R	Coefficient de corrélation
R^2	Coefficient de détermination
RF	<i>Rectus femoris</i>
R_{max}	Rayon maximal de granulométrie
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSB	Rapport signal sur bruit
RT	Rosin thresholding
SAS	Statistical analysis System
sk	Facteur d'asymétrie (pour skewness)
SM	<i>Semimembranosus</i>
ST	<i>Semitendinosus</i>
T	Tesla
T^*	Seuil optimal
T_1	Temps de relaxation
TCIM	Tissu conjonctif intramusculaire
WS	Water saturated
ε	Niveau de confiance
μ^{ref}	Carte de référence
μ_{ε}^{ref}	Carte de référence seuillée au niveau de confiance ε
σ	Ecart type

INTRODUCTION

Avec une production de 2,2 millions de tonnes et une consommation de 27 kg par an et par habitant d'équivalents carcasse, la France est le premier pays producteur et le premier pays consommateur de viande bovine au sein de l'Union Européenne. Il faut cependant noter que ces chiffres sont très inférieurs à ceux du début des années 1980 au cours desquelles la consommation de viande bovine avait atteint une valeur maximale avec 33 kg par an et par habitant d'équivalents carcasses. Cette chute de près de 20% en 25 ans, n'a pas été particulièrement liée aux crises sanitaires de 1996 et 2000 qu'a connues la filière bovine, mais a été beaucoup plus dépendante de la mauvaise image nutritionnelle et du faible rapport qualité/prix de cette viande. Cette lourde tendance à la baisse semble cependant être freinée depuis quelques années grâce aux efforts développés par la filière pour regagner la confiance des consommateurs, en termes de traçabilité et de garantie de qualité comme le souligne l'existence de plus de quinze labels rouges et autres critères de qualité.

La viande bovine, dont la qualité est toujours difficilement maîtrisable, reste cependant une viande onéreuse par rapport aux viandes blanches comme le porc et les volailles. En ce qui concerne la viande bovine, le critère principal de qualité est la tendreté qui est positionnée par le consommateur devant la flaveur, la jutosité et la couleur. La tendreté de la viande est donc la qualité sur laquelle la filière souhaite faire porter le maximum d'effort pour non seulement l'améliorer mais aussi réduire sa variabilité inter animale. La dureté de la viande résulte de la résistance mécanique des deux principales composantes structurales du muscle : les fibres musculaires et le tissu conjonctif. Les propriétés de ces deux compartiments du muscle sont influencées par de très nombreux facteurs biologiques et technologiques jouant un rôle depuis la sélection génétique des animaux jusqu'à la phase de consommation de la viande : i) au cours de l'élevage des animaux (nutrition, exercice, stress), ii) lors de la phase de transformation du muscle en viande (réfrigération, stockage) et iii) lors de la cuisson (mode, température et durée). Les propriétés des fibres musculaires et notamment leur résistance mécanique évoluent selon les conditions de maturation (temps, température), depuis un maximum lors de l'installation de la *rigor mortis* jusqu'à une valeur asymptotique correspondant au minimum de participation de la structure myofibrillaire à la dureté de la viande. La teneur, la composition, les propriétés thermiques et la morphologie du tissu conjonctif varient énormément selon les muscles, la race ou l'âge de l'animal et déterminent le potentiel de tendreté de la viande. C'est d'ailleurs sur la base des caractéristiques de la

composante conjonctive que s'établit le prix des morceaux. En faisant varier les conditions de conditionnement *post mortem*, la part de dureté liée aux fibres musculaires peut donc être contrôlée. En revanche, le tissu conjonctif engendre une dureté de base qui ne peut être réduite que par la mise en œuvre de procédés d'attendrissage mécanique (broyage/restructuration), chimique (marinade) ou thermique (cuisson longue durée à température élevée). Ces procédés ne sont pas adaptés, pour des raisons d'acceptabilité par le consommateur ou des raisons règlementaires, aux muscles potentiellement tendres et donc à cuisson rapide. Ainsi l'enjeu de l'étude du tissu conjonctif n'est pas obligatoirement de chercher à réduire la dureté de la viande, comme pour les fibres musculaires, mais de pouvoir la prédire de façon à valoriser aux mieux les différents muscles de la carcasse (extension de découpe, par exemple) et à orienter les différents morceaux vers l'utilisation la plus adaptée (cuisson, transformation). Ainsi malgré une faible proportion dans le muscle par rapport aux myofibrilles (15% contre 85%), le tissu conjonctif influence fortement la texture de la viande cuite. Les nombreuses études sur sa quantité et sa stabilité thermique ont montré les limites de ces variables pour expliquer les différences de tendreté inter animales observées pour un muscle donné. Les études sur la composition du tissu conjonctif ont été beaucoup moins nombreuses et se sont limitées à décrire qualitativement les macromolécules présentes, sans pouvoir établir de relation avec la dureté. Enfin, certains auteurs ont montré l'influence de la structure spatiale du tissu conjonctif sur la texture de la viande. Cependant ces études ont été assez limitées faute d'outils de quantification adéquats.

Le développement ces dernières années des outils d'acquisition, de traitement et d'analyse d'images a ouvert de nouvelles perspectives. Les applications en agro-alimentaire de ces techniques sont, d'ailleurs, de plus en plus répandues. Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée à l'étude de la relation entre d'une part la texture de la viande bovine évaluée de manière objective (instrumentale) et subjective (analyse sensorielle) et d'autre part les caractéristiques morpho-anatomiques du tissu conjonctif. Comme le tissu conjonctif présente plusieurs niveaux de structuration, j'ai cherché à répondre à cette problématique par une approche multi échelle, en combinant l'utilisation de deux modalités d'imagerie : l'histologie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Cette thèse est composée de trois parties principales. La première consiste en une revue bibliographique présentant dans un premier temps les caractéristiques du tissu conjonctif et leur relation avec la tendreté de la viande cuite, et dans un deuxième temps les principales techniques de traitement des images. Une seconde partie détaille l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail avec une attention particulière aux outils d'analyse

d'images. La troisième partie présentant et discutant les résultats obtenus dans cette étude s'articule en quatre chapitres. Le premier décrit l'étude préliminaire qui a permis d'éprouver la validité des techniques à mettre en œuvre et le plan d'expérience employé. Le deuxième chapitre est consacré à la mise au point de l'outil de traitement et d'analyse d'images. Le chapitre suivant met en application les validations développées dans les deux parties précédentes afin d'étudier la relation entre l'organisation spatiale du tissu conjonctif et la tendreté de la viande cuite. Le dernier chapitre est consacré à l'analyse de la composition du tissu conjonctif en relation avec la répartition spatiale des lipides et les modalités d'imagerie du muscle mises en œuvre. Enfin, les perspectives, à la fois en termes de potentiel d'application des méthodes développées et de futurs axes de recherche sont présentées en conclusion

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.1 TISSU CONJONCTIF INTRAMUSCULAIRE

Le muscle peut être considéré comme un matériau composite dont la structure, d'une très grande complexité, est directement reliée à sa fonction physiologique de génération et de transmission de forces, assurant posture et mobilité (Lepetit et Culioli, 1994). Il est constitué d'une matrice de tissu conjonctif (15%) extrêmement résistante et assurant la transmission aux parties osseuses des forces générées par les fibres musculaires (85%) (Mc Cormick, 1994). Celles-ci transforment l'énergie chimique, directement disponible dans les molécules d'ATP (adénosine triphosphate), en énergie mécanique lors du glissement, les uns par rapport aux autres, des filaments fins et des filaments épais des structures contractiles élémentaires que sont les sarcomères. Les propriétés mécaniques de la viande, résultat de la transformation *post mortem* du muscle, régissent ses caractéristiques de texture et notamment sa tendreté ; elles sont directement dépendantes non seulement des propriétés de chacune des structures conjonctive et myofibrillaire mais aussi de leurs interactions. Ce travail de thèse concernant exclusivement le rôle du tissu conjonctif sur les propriétés de texture de la viande, la structure myofibrillaire ne fera pas l'objet de développement dans cette partie de la bibliographie. Celle-ci se limitera donc à la composition et la structure du tissu conjonctif intramusculaire, souvent appelé matrice extracellulaire et qui, outre son rôle de transmission de force, procure forme et support aux composants cellulaires du muscle (vaisseaux, nerfs, neurones) (Mc Cormick, 1994).

A.1.1 Organisation du tissu conjonctif dans le muscle

Le tissu conjonctif s'organise en trois niveaux (Figure A-1).

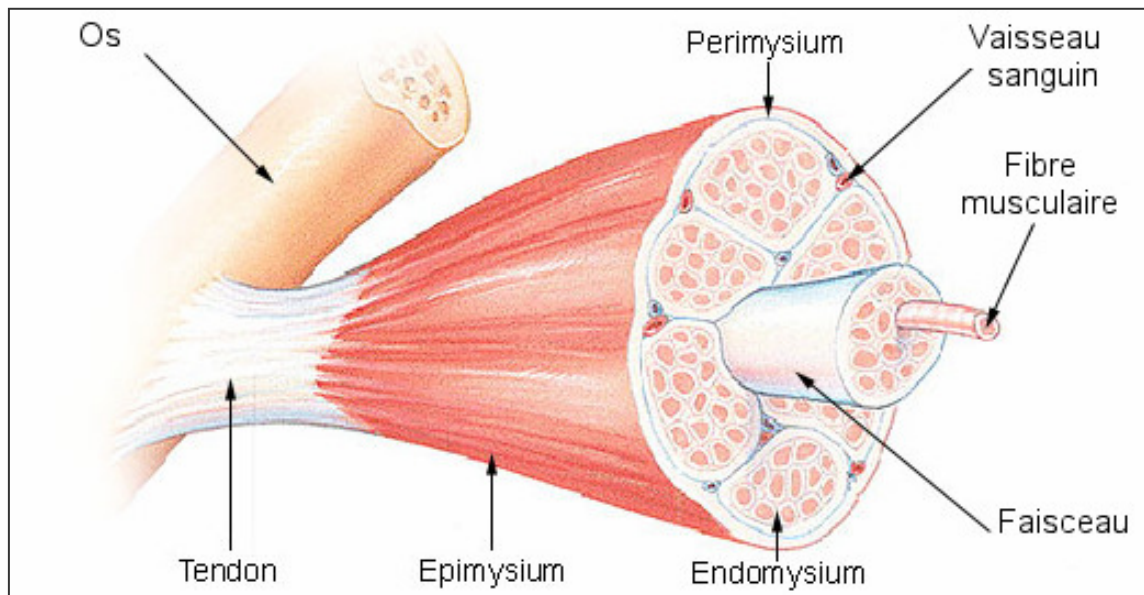


Figure A-1. Organisation des différents niveaux de tissu conjonctif dans le muscle squelettique

Le niveau le plus fin ($0,2\ \mu\text{m}$) qui entoure chaque fibre musculaire ($50\ \mu\text{m}$ de diamètre) correspond à l'endomysium. Celles-ci sont regroupées en faisceaux délimités par le périmysium (10 à $200\ \mu\text{m}$ d'épaisseur). Le muscle entier est, enfin, enveloppé par l'épimysium (pouvant posséder une épaisseur de plusieurs millimètres chez le bovin), également appelé aponévrose et se prolongeant jusqu'aux tendons (Taylor, 2004).

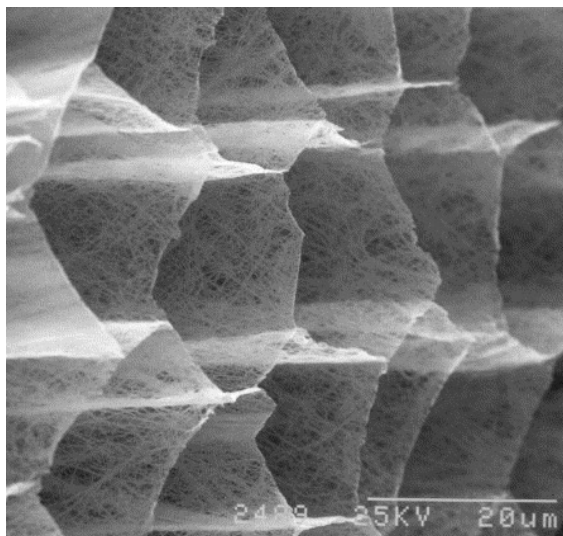


Figure A-2. Photographie en microscopie électronique à balayage de l'endomysium du muscle Sternomandibularis de bovin après extraction des composants myofibrillaires à l'aide de soude (NaOH).

On distingue aisément l'enchevêtrement formé par les fines fibrilles ondulées de collagène. Tirée de (Purslow et Trotter, 1994)

L'endomysium est constitué d'un enchevêtrement paraissant aléatoire de fibrilles ondulées de collagène (Figure A-2). Ces fibrilles ne sont pas organisées en fibres comme dans

le périmysium (Rowe, 1978), mais constituent plutôt une membrane associée à quelques fibres de collagène (Light, 1987; Bailey et Light, 1989). Ce maillage peut facilement se réorienter en cas de changements morphologiques du muscle. Les fibrilles de collagène de l'endomysium ont un diamètre inférieur à celles formant les fibres du périmysium dans le muscle *Semitendinosus* de mouton (47 et 63 nm respectivement) (Rowe, 1978) ou de porc (Fang *et al.*, 1999) (48 et 67 nm respectivement). Le diamètre des fibres de collagène varie également d'un muscle à l'autre, de 51 nm pour le muscle *Longissimus dorsi* à 92 nm pour le muscle *Gastrocnemius* de bovin (Light *et al.*, 1985).

Dans le périmysium les fibres de collagène sont majoritairement ondulées et forment une structure en treillis (criss-cross lattice) bien ordonnée (Rowe, 1974) (Figure A-3). Au repos, les fibres de collagène du périmysium forment un angle de 55° avec les myofibres selon un taux d'ondulation de 1,2. Cet angle et cette ondulation varient au gré des contractions et des étirements du muscle (Offer *et al.*, 1989).

Dans la plupart des muscles, l'épimysium présente la même organisation que celle décrite dans le périmysium (Figure A-3). Cependant, dans certains muscles où l'épimysium participe clairement au transfert de charge vers des structures adjacentes (exemple : muscle *Semitendinosus*), les fibres de collagène s'organisent en paquets denses, similaires à ceux observés dans la structure des tendons (Harries *et al.*, 1972).

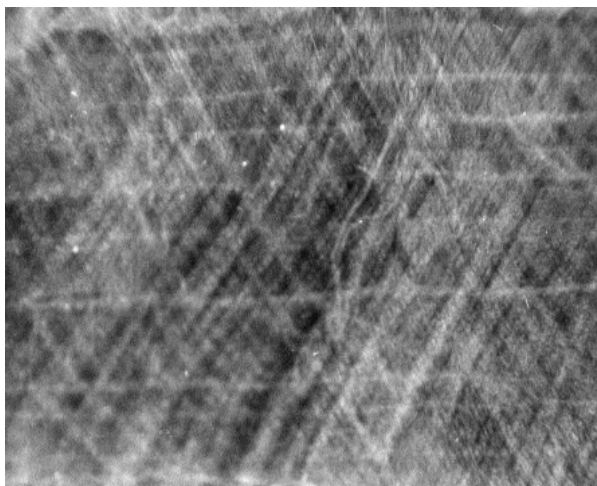


Figure A-3. Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans l'épimysium du muscle Sternomandibularis de bovin. Les lignes horizontales signalent les contours des myofibres à la surface du muscle. Les fibres de collagène de l'épimysium en surépaisseur apparaissent sous la forme de deux trames de fibres parallèles formant un angle d'environ 54° par rapport à la direction des myofibres (Harries *et al.*, 1972). Une structure semblable est retrouvée dans le périmysium.

La teneur en collagène endomysial varie peu entre les différents types de muscle, et ne semble donc pas impliquée dans la variabilité de la texture de la viande (Light *et al.*, 1985 ; Purslow, 1999 ; Nakamura *et al.*, 2003). L'endomysium représente entre 0,1 et 0,5% de la masse musculaire pour Light *et al.* (1985) et entre 0,47 et 1,20% pour Purslow (1999), soit un facteur de variation d'environ 2,5, alors que le périmysium peut varier d'un facteur multiplicatif de 10 selon les types de muscle (Purslow, 1999). Comme l'épimysium est paré

par le boucher lors de la découpe des morceaux, il n'intervient pas lors de la consommation de la viande et ne participe donc pas aux propriétés de texture perçues lors de la mastication. En revanche, le périmysium, qui constitue l'essentiel (90%) du tissu conjonctif intramusculaire (Mc Cormick, 1994) et qui présente une forte variabilité qualitative et quantitative joue un rôle prépondérant dans le déterminisme de la texture de la viande ; c'est d'ailleurs sur cette structure que se sont focalisées la plupart des études portant sur les relations entre les caractéristiques du tissu conjonctif et la texture de la viande.

La teneur en collagène total dans le muscle varie considérablement d'un muscle à l'autre (Rhee *et al.*, 2004 ; Torrescano *et al.*, 2003), de l'ordre de 1 à 6 entre les muscles *Psoas major* (filet) et *Infraspinatus* (paleron) (Mc Keith *et al.*, 1985), conditionnant le mode de cuisson et donc de consommation de ces deux types de muscles : grillé pour le premier et braisé pour le second. L'influence de ces variations de teneur en collagène total sur la tendreté de la viande sera abordée lors des paragraphes suivants.

Le périmysium présente plusieurs niveaux d'organisation (Schmitt *et al.*, 1979) (Figure A-5). Le niveau le plus grossier correspond à ce qu'il est convenu d'appeler le périmysium primaire. Le périmysium se divise ensuite en trames secondaire et tertiaire de plus en plus fines et formant un réseau plus ou moins régulier. La hiérarchie des faisceaux se décrit généralement en sens inverse de celle du périmysium. Ainsi le premier niveau de faisceaux après la fibre musculaire se dénomme faisceau primaire. Les faisceaux secondaires regroupent plusieurs faisceaux primaires et ainsi de suite pour les faisceaux tertiaires et quaternaires. Depuis longtemps, les bouchers définissent la texture de la viande en terme de grain. Le grain est assimilé à la taille des faisceaux de fibres musculaires délimités par le périmysium : un grain plus fin étant assimilé à une viande plus tendre. Etablir la relation entre tendreté et taille des faisceaux de fibres musculaires a donc une importance pratique et permettrait d'apporter des réponses aux professionnels de la viande. Cependant, en comparant la « texture » de plusieurs muscles, il apparaît clairement que la taille des faisceaux n'est pas le seul paramètre important. Purslow (2005) a d'ailleurs complété cette notion de grain, en introduisant l'épaisseur du périmysium et le degré d'infiltration de gras. La forme des faisceaux n'a été, quant à elle, que très peu étudiée, bien qu'elle semble être liée à la nature et l'intensité des contraintes mécaniques développées par les muscles et puisse être de fait directement liée à leur résistance mécanique. Cette lacune provient probablement de la difficulté à mettre au point une méthode permettant d'analyser précisément l'organisation du tissu conjonctif.

A.1.1.1 L'épaisseur du périmysium

Purslow (1985) a observé que lorsque la viande cuite est étirée perpendiculairement au sens des fibres, les premiers points de fracture apparaissent au niveau de la jonction périmysium-myofibres. Ainsi le volume et l'épaisseur du périmysium joueraient un rôle dans le déterminisme de la tendreté de la viande.

L'épaisseur du périmysium, et par conséquent sa robustesse, sont le résultat de l'empilement de plusieurs couches de fibres de collagène organisées en faisceaux (Liu *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 2003) (Figure A-4). Elle augmente avec le nombre et la dimension de ces couches (Fang *et al.*, 1999). Les faisceaux de fibres de collagène sont ondulés ce qui permet la transmission des forces durant la contraction tout en répartissant les efforts sur l'ensemble du tissu pour éviter les ruptures.

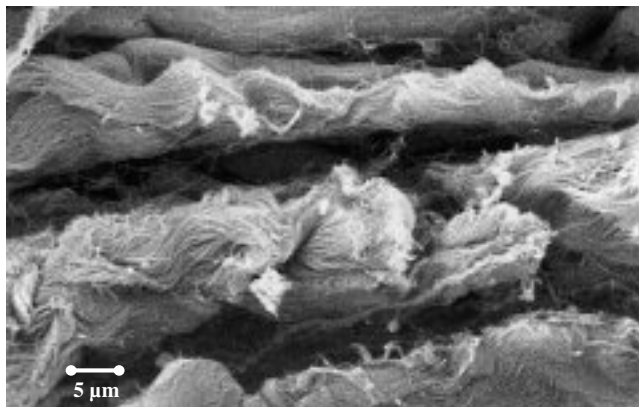


Figure A-4. Périmysium d'un muscle *Pectoralis profundus* de poulet en microscopie électronique (Nakamura *et al.*, 2003)

Cependant mesurer l'épaisseur du périmysium de manière fiable et représentative reste difficile à mettre en œuvre. Le niveau de périmysium observé doit être défini précisément, car les différences entre les niveaux de périmysium sont importantes : de 30 μm pour le périmysium secondaire à 120 μm pour le périmysium primaire (Torrescano *et al.*, 2001 ; Bonny *et al.*, 2000).

L'épaisseur du périmysium, tout comme la taille des faisceaux, ne peut expliquer à elle seule les variations de tendreté. D'autres paramètres sont à prendre en compte, comme la notion de degré d'organisation de la trame. Par exemple, le muscle *Psoas major*, très tendre, présente une trame d'allure très uniforme, contrairement au *Biceps femoris* dont le réseau possède plusieurs degrés d'organisation (Strandine *et al.*, 1949) (Tableau A-1).

Tableau A-1. Classification de muscles de bovins sur la base de la taille des faisceaux de fibres musculaires et du profil du tissu conjonctif qui les délimitent (d'après Strandine *et al.*, 1949).

Faisceaux larges et périmysium épais	Faisceaux de taille moyenne et périmysium plus fin	Petits faisceaux et périmysium très fin	Faisceaux difficiles à distinguer
<i>Brachiocephalicus</i>	<i>Brachialis</i>	<i>Biceps brachii</i>	<i>Adductor</i>
<i>Cutaneus</i>	<i>Oblique externe</i>	<i>Complexus</i>	<i>Intercostalis</i>
<i>Pectoralis profundus</i>	<i>Latissimus dorsi</i>	<i>Diaphragme</i>	<i>Iliacus</i>
<i>Semitendinosus</i>	<i>Longissimus dorsi</i>	<i>Extensor carpi radialis</i>	<i>Intra-transversus colli</i>
<i>Sternocephalicus</i>	<i>Rectus abdominis</i>	<i>Gastrocnemius</i>	<i>Longissimus costarum</i>
<i>Pectoralis superficialis</i>	<i>Rhomboïdeus</i>	<i>Gluteus medius</i>	<i>Infraspinatus</i>
<i>Trapezius</i>	<i>Serratus ventralis</i>	<i>Gluteus profundus</i>	<i>Multifidus dorsi</i>
	<i>Splenius</i>	<i>Gracilis</i>	<i>Pectineus</i>
	<i>Tensor fascia latae</i>	<i>Oblique interne</i>	<i>Psoas major</i>
	<i>Transversus abdominis</i>	<i>Rectus femoris</i>	<i>Psoas minor</i>
	<i>Vastus intermedius</i>	<i>Subscapularis</i>	<i>Teres major</i>
	<i>Vastus medialis</i>	<i>Supraspinatus</i>	<i>Triceps brachii</i>
		<i>Vastus lateralis</i>	

A.1.1.2 La taille de faisceaux

Il n'existe pas dans la littérature de définition précise du faisceau de fibres. Cependant l'organisation hiérarchique suivante est couramment admise. Les faisceaux primaires sont le niveau élémentaire d'organisation des fibres. Ils sont regroupés en faisceaux secondaires puis tertiaires et ainsi de suite jusqu'à l'épimysium qui enveloppe le muscle entier (1986) (Figure A-5). Pourtant en observant un grand nombre de coupes musculaires, trois critères majeurs caractérisant un faisceau de fibres primaire peuvent être discernés :

- il s'agit de la structure de niveau immédiatement supérieur à la fibre musculaire (myofibre)
- le faisceau primaire contient entre 25 et 200 fibres musculaires, ce qui équivaut à environ une surface comprise entre 50 000 et 400 000 μm^2 (pour un diamètre moyen de fibre musculaire de 50 μm)
- les bordures de fibres à la périphérie du faisceau sont alignées de sorte que le périmysium forme une limite rectiligne au faisceau (Figure A-6).

Une fois le faisceau primaire défini, il est alors possible de définir les ordres supérieurs par référence aux faisceaux primaires.

La taille des faisceaux de fibres musculaires varie d'un muscle à l'autre : elle est probablement liée à la distribution des forces que le muscle développe *in vivo*.

Qualitativement, il y a une relation entre la taille de faisceaux, l'épaisseur du périnysium, la longueur des faisceaux et les efforts en cisaillement que génèrent les myofibres et que subit la structure conjonctive. Par exemple, chez le bovin, le muscle *Pectoralis profundus*, soumis à de grands efforts en cisaillement, présente des faisceaux primaires de grande taille séparés par des trames épaisses de périnysium. En revanche, un muscle long comme le *Sternocephalicus* soumis quant à lui à de faibles efforts de cisaillement, est constitué de petits faisceaux primaires et secondaires, séparés par un périnysium fin (Harries *et al.*, 1972). De plus Purslow (1999) suggère que la division du muscle en faisceaux par le périnysium reflète l'adaptation du muscle aux contraintes de cisaillement impliquées par les changements de forme lors des phases de contraction et d'extension. Ainsi un muscle exposé physiologiquement à de violentes contraintes doit présenter de larges faisceaux capables de générer des forces élevées et un périnysium épais capables de les supporter et de les transmettre (Harries *et al.*, 1972).

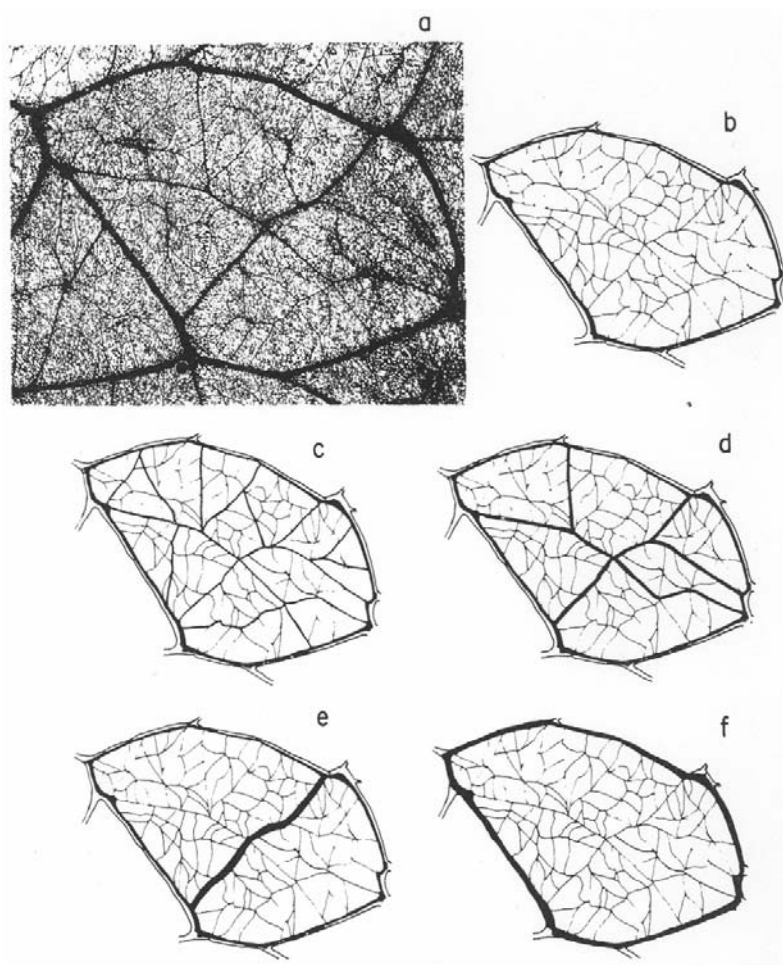


Figure A-5. Caractérisation des différents types de faisceaux à l'intérieur d'un faisceau principal. On peut distinguer ensuite la hiérarchisation des faisceaux selon l'ordre suivant: faisceaux primaires (b), faisceaux secondaires (c), faisceaux tertiaires (d), faisceaux quaternaires (e) et enfin faisceau principal (f).

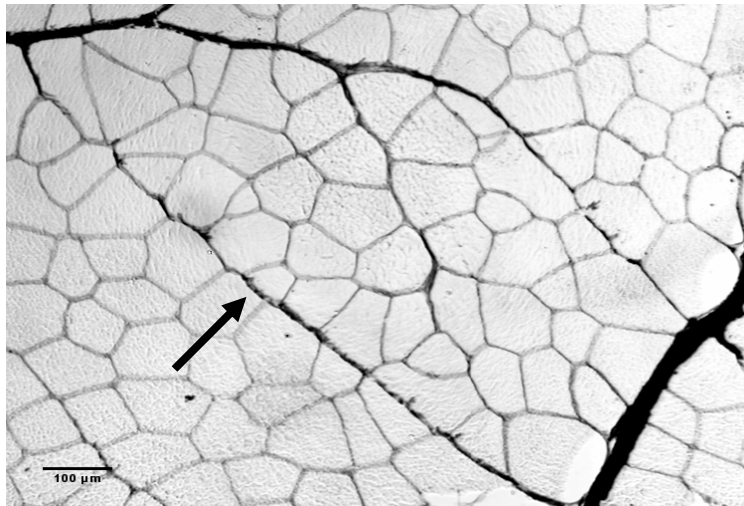


Figure A-6. Coupe musculaire colorée au Rouge Sirius, identifiant ici en noir le tissu conjonctif. On peut remarquer que les fibres musculaires (ici en gris) au bord du faisceau primaire sont alignées.

A.1.2 Composition du tissu conjonctif intramusculaire

Bien que la quantité de tissu conjonctif dans le muscle soit toujours faible par rapport à celle des myofibres (entre 1 et 15%), celui-ci joue un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de l'organisation des structures musculaires fibres, ainsi que dans la transmission des forces générées par la contraction des myofibres. Il est composé de protéines fibreuses représentées principalement par le collagène et, dans une bien moindre mesure, par l'élastine (moins de 2%). Il est également constitué de mucopolysaccharides et de protéoglycannes, formant une substance fondamentale conjonctive où baignent les fibroblastes (cellules spécifiques de ce tissu).

A.1.2.1 Le collagène et ses différents isoformes

Le collagène, représentant environ 40% du poids sec et 80% des protéines de la matrice extracellulaire du tissu musculaire, est le composant le plus rigide du tissu musculaire (Bailey, 1972). Il participe à ce qu'il est convenu d'appeler la dureté de base de la viande, c'est-à-dire la part de la dureté indépendante des variations liées au processus d'attendrissage *post mortem*, qui concerne quasi exclusivement les fibres musculaires (Light 1987). L'unité de base du collagène est une molécule de 300 kDa, constituée de 3 sous unités polypeptidiques appelées chaînes α . Celles-ci, sont fortement associées entre elles par des liaisons Hydrogène pour former une structure en triple hélice avec deux extrémités C et N terminales non hélicoïdales, appelées télopeptides. La partie centrale de la triple hélice de collagène est constituée majoritairement du motif répétitif d'acides aminés GLY- X- Y, responsable de la forte compacité de la molécule. La richesse (23% des acides aminés) en proline et hydroxyproline est aussi caractéristique de la molécule de collagène qui subit d'importantes modifications post-traductionnelles intra- (hydroxylation sélective de la lysine et de la

proline) et extracellulaires (protéolyse des télopeptides et établissement de liaisons de réticulation). Les molécules de collagène, de 280 nm de longueur et 1,5 nm de diamètre, s'agrègent, tête à queue, avec un décalage systématique d'un quart de molécule, pour former des penta fibrilles. C'est entre les télopeptides et les chaînes hélicoïdales que s'établissent des liaisons intermoléculaires divalentes ou trivalentes associant entre elles 2 ou 3 molécules de collagène de la même micro fibrille ou de micro fibrilles adjacentes. Le degré de réticulation, défini par le nombre et la nature des liaisons covalentes établies, conditionne la stabilité thermique du collagène et en conséquence la dureté de la viande après cuisson (Bailey et Light, 1989).

La molécule de collagène varie également en termes de taille et de composition, générant de nombreux types de collagène. Vingt-sept isoformes (dont 7 dans le muscle strié squelettique) ont été identifiés jusqu'à présent (Listrat A. *et al.*, 1998 ; Listrat *et al.*, 2000 ; Sato *et al.*, 2002). Ils sont le produit de plus de 35 gènes différents et présentent une grande diversité de propriétés structurales et fonctionnelles. La localisation et les caractéristiques des 7 collagènes du muscle strié sont rappelées dans le tableau A-2.

Les quatre principales formes sont les types fibrillaires I, III et V et le type IV non fibrillaire. La proportion des différents types de collagène varie d'un muscle à l'autre et pourrait donc contribuer aux variations de la résistance mécanique du muscle. Notamment la proportion de collagène de type III varie de 0,4 à 2,5% du collagène total pour les muscles *Longissimus dorsi* et *Gastrocnemius*, respectivement (Light, 1987). En ce qui concerne les collagènes fibrillaires, comme les types I, III et V, les fibrilles s'associent à leur tour pour former les fibres de collagène proprement dites. Ces fibres sont extrêmement résistantes (module d'élasticité 10^9 N/cm^2) et quasiment inextensibles. La déformation du tissu conjonctif n'est de fait possible que par modification du degré d'ondulation et de l'angle d'orientation de ces fibres (Figure A-3 et Figure A-4). Ces fibres sont hétérotypiques. Elles contiennent toujours du collagène de type I et des proportions variables de types III et V, qui définissent le type et le diamètre de la fibre de collagène.

Chez le bovin, le type I se situe principalement dans l'épimysium et le périmysium, tandis que le type III se retrouve plutôt dans le périmysium sous la forme de fines bandelettes (Bailey *et al.*, 1979). Par ailleurs, les fibres de collagène de type I ont un diamètre plus grand que celles de type III (Nishiumi, 1999) et les fibres de type III sont plus stables à la chaleur (Burson et Hunt, 1986). La proportion de collagène de type III est la plus élevée dans le périmysium des muscles les plus durs selon Bailey *et al.* (1979). Cependant Light *et al.*

(1985) n'ont pas mis en évidence de relation entre le rapport collagène III sur collagène I et les propriétés mécaniques de la viande. Le collagène de type I flexible est très résistant et permet le maintien de la structure de la matrice extracellulaire. Le collagène de type III forme des fibres réticulaires qui régulent la formation des fibres de type I. La seconde fonction du collagène de type III consiste à assurer la liaison entre l'endomysium et le périomyium. Le collagène de type V forme avec le type III les fibres de réticuline. Le collagène V apparaît au niveau de la membrane basale, qui supporte les fibres de collagène de l'endomysium, où il sert de lien avec les fibres de collagène du périomyium (Nishiumi, 1999). Le collagène V comme le collagène III, joue également un rôle sur la régulation du diamètre des fibres de collagène I (Fichard *et al.*, 1995). Le collagène de type IV non fibrillaire constitue la membrane basale en formant un réseau qui piège la laminine et les protéoglycannes (Van der Rest et Garrone, 1991).

Outre les formes majoritaires précitées, il existe dans le muscle les types VI, XII et XIV. Le rôle du collagène de type VI est assez flou. Il semblerait servir d'interface entre le réseau formé par les fibres de collagène et les cellules (Van der Rest et Garrone, 1991), il posséderait aussi un site de fixation de la décorine lui permettant de réguler l'organisation structurale de la matrice extracellulaire en contrôlant la formation des fibrilles de collagène (Bidanset *et al.*, 1992).

Les collagènes de types XII et XIV sont dénommés collagènes FACIT pour Fibril-Associated Collagen with Interrupted Triple helix. Ils interviennent en diminuant l'interaction entre les fibres de collagène, facilitant ainsi leur glissement respectif (Van der Rest et Dublet, 1996). Le collagène de type XII joue un rôle dans le développement embryonnaire. Il intervient, de plus, dans la différenciation des adipocytes (Tahara *et al.*, 2004). Le type XIV joue, quant à lui, un rôle dans le développement musculaire et sa régénération (Tono-Oka *et al.*, 1996).

Tableau A-2. Structure et localisation des différents types de collagènes présents dans le muscle squelettique. D'après Nakajima et al., 1998 et Nishiumi, 1999.* fibril-associated collagen with interrupted triple helix.

Type de collagène	Structure	Localisation		
		Périmysium	Endomysium	Vaisseaux
I	Fibrillaire	++	+	++
III	Fibrillaire	+	+	+
IV	Feuillet	-	+	++
V	Fibrillaire	+	+	++
VI	Collier de perles	+	+	+++
XII	FACIT *	+	+ (poulet) - (bovin)	+
XIV	FACIT *	+	+ (poulet) - (bovin)	

A.1.2.2 L'élastine

Cette protéine n'est présente dans le muscle que dans l'épimysium et le périmysium (Rowe, 1986) ; elle est en revanche le constituant majeur des vaisseaux sanguins, de certains ligaments et se trouve aussi en proportion plus faible dans la peau et les tissus pulmonaires (Nishiumi, 1999). Elle constitue le matériau amorphe des fibres élastiques du tissu conjonctif, constituées par l'assemblage de fibrilles de glycoprotéines (diamètre de 11 nm) (Ross et Bornstein, 1969). Deux groupes de fibres élastiques peuvent être différenciés dans le tissu conjonctif : l'un caractérisé par des fibres fines (diamètre de 1-2 μm) disposées parallèlement aux fibres de collagène et l'autre constitué de fibres épaisses (5-10 μm), disposées parallèlement aux cellules musculaires et concentrées dans les nœuds de périmysium (Rowe, 1986 ; Greaser, 1997). Contrairement aux fibres de collagène, les fibres d'élastine sont branchées, beaucoup plus extensibles et moins rigides que celles de collagène (module d'élasticité 10^6 contre 10^9 pour le collagène) (Viidik *et al.*, 1982).

L'élastine est une protéine d'un poids moléculaire de 74 kDa. Bien qu'elle présente une composition en acides aminés voisine de celle du collagène avec une forte proportion de glycine, proline et alanine, sa structure et ses propriétés sont très différentes. En effet, elle se présente sous forme d'un réseau de chaînes moléculaires organisées de façon aléatoire lui conférant une structure amorphe. L'élastine contient comme le collagène des liaisons de réticulations formées à partir de résidus lysine. Toutefois, la nature de ces liaisons est différente de celle du collagène, puisque formées par des acides aminés spécifiques : la

desmosine et l'isodesmosine. L'élastine est également très hydrophobe car 75% de sa séquence est composé d'acides aminés hydrophobes (Vrhovski et Weiss, 1998).

Dans les muscles contenant peu d'élastine, cette molécule se trouve en quasi totalité dans la paroi des artérioles (Bendall, 1967). Les muscles contenant beaucoup d'élastine (*Semitendinosus* et *Latissimus dorsi*) sont impliqués dans la propulsion de l'animal. Les fibres élastiques fournissent l'énergie élastique nécessaire à l'épaule et la hanche pour l'initiation de la propulsion (Bendall, 1967).

Bien que pratiquement insensible à la chaleur, la contribution de l'élastine à la dureté de la viande est mineure, en raison probablement de sa faible teneur dans la plupart des muscles. En effet, des muscles de bovins présentant des teneurs en élastine très variables (Tableau A-3) produisent de la viande de dureté équivalente (Bendall, 1967 ; Dransfield, 1977 ; Cross *et al.*, 1973). Cependant compte tenu de la difficulté pour dénaturer ou solubiliser l'élastine par chauffage, elle doit être responsable d'une part de la dureté de la viande cuite provenant de muscles riches en élastine, comme le *Semitendinosus* ou le *Latissimus dorsi*.

Tableau A-3. Teneur en élastine de différents muscles bovins. D'après Bendall, 1967.

Position	Nom	Collagène (% poids sec)	Elastine (% poids sec)	Elastine (% tissu conjonctif total)
Epaule	<i>Infraspinatus</i>	13,3	0,12	0,9
	<i>Latissimus dorsi</i>	4,0	2,0	33,0
	<i>Pectoralis</i>	4,0	0,41	5,5
Dos	<i>Longissimus dorsi</i>	2,3	0,07	2,9
Cuisse	<i>Biceps femoris</i>	4,2	0,12	2,7
	<i>Gluteus medius</i>	1,6	0,18	10,0
	<i>Rectus femoris</i>	1,9	0,07	3,6
	<i>Semitendinosus</i>	3,1	1,82	37,0
	<i>Tensor fascia latae</i>	3,1	0,30	23,0

A.1.2.3 Les protéoglycannes dont la décorine

Les protéoglycannes sont des macromolécules constituées de chaînes glucidiques polyanioniques (GAGs) liées de manière covalente à un cœur peptidique. Ce sont les composants majeurs de la substance amorphe dans laquelle baignent les fibres du tissu conjonctif (Nishiumi, 1999). Ils peuvent lier de très grandes quantités d'eau et interagissent avec les différents cellules et composants du tissu conjonctif (Nishiumi, 1999). Ils jouent, en outre, un rôle important dans la fonction et la stabilité de la matrice extracellulaire. Ils assurent, entre autres, la résistance aux forces de compression, l'hydratation des tissus, la

régulation de la diffusion et du flux des macromolécules, la régulation de la prolifération cellulaire et la présentation des facteurs de croissance aux cellules (Nishiumi, 1999).

La décorine, qui se trouve dans la plupart des tissus conjonctifs, constitue le protéoglycane majoritaire du tissu conjonctif intramusculaire. C'est un petit protéoglycane (chondritine sulfate/dermatan sulfate) dont le cœur protéique est riche en leucine (70 kDa). Ce cœur protéique permet à la décorine de s'associer aux molécules de collagène I, II et III. Elle a été nommée ainsi, suite aux observations en microscopie électronique, la décrivant comme une molécule décorant les fibres de collagène (Scott, 1980). Scott (1996) a suggéré que la décorine jouait le rôle de ligand entre deux molécules de collagène, maintenant les molécules parallèles dans la fibrille et modulant la distance entre elles. En stabilisant la fibrille, elle favoriserait la fibrillogenèse et participerait à la régulation de l'épaisseur des fibres de collagène (Vogel *et al.*, 1984). Elle permettrait, aussi, l'alignement des sites de réticulation intermoléculaire, et jouerait ainsi un rôle dans la dureté de la viande (Nishiumi, 1999). La décorine interviendrait enfin comme régulateur de l'activité du facteur de croissance et donc de la croissance cellulaire (Eggen et Ekholdt, 1995). Il est à noter que les protéoglycannes présentent la particularité d'avoir un turnover élevé ; en se dégradant rapidement ils libèrent de l'espace pour permettre l'expansion de la matrice extracellulaire (Bailey et Light, 1989).

A.1.2.4 Les lipides intramusculaires

Ils représentent le plus souvent 1 à 5 % du tissu musculaire et sont constitués principalement par des lipides de structure (phospholipides membranaires) et des lipides de réserve (triglycérides des adipocytes). Les différences de teneurs en lipides entre muscles et entre animaux sont principalement dues aux variations de quantités de triglycérides. En effet, la teneur en phospholipides varie peu puisque dépendant seulement de la densité de structures membranaires, cellulaires et intracellulaires. Le type métabolique des fibres musculaires, influence donc la teneur en phospholipides, alors que la quantité de triglycérides est le résultat à plus ou moins long terme de l'état nutritionnel de l'animal, autrement dit de son état d'engraissement (Goll *et al.*, 1984). Si une partie des lipides se trouve sous forme de gouttelettes lipidiques dans le sarcoplasme, la majorité est localisée dans des adipocytes soit isolés entre les fibres soit regroupés le long des vaisseaux sanguins dans le périmysium ou l'épimysium. Cette seconde localisation est connue sous le nom de « persillé » dans la viande. Les adipocytes sont enveloppés dans le tissu conjonctif par une fine enveloppe de collagène (Sorland *et al.*, 2004) à proximité des vaisseaux sanguins (Tume, 2004). Dans les premiers stades d'engraissement, le diamètre des cellules est généralement faible (40 à 60 μm). Pour

être visibles, les amas adipeux doivent regrouper au moins 10 à 15 cellules. L'engraissement de l'animal conduit à la fois à l'hyperplasie et à l'hypertrophie de ces adipocytes. L'incidence des lipides sur la qualité de la viande porte principalement sur la flaveur et à un degré moindre sur la jutosité. Son rôle sur la tendreté est cependant beaucoup plus controversé. Toutefois, un état d'engraissement très poussé comme c'est le cas dans les systèmes de production de viande au Japon conduit à une modification de la structure et donc de la résistance mécanique du tissu conjonctif (Nishimura *et al.*, 1999).

A.1.3 Implication du tissu conjonctif intramusculaire dans la tendreté de la viande

Les caractéristiques "teneur, composition, morphologie" du tissu conjonctif intramusculaire varient fortement entre muscles et, pour un même muscle, entre animaux et sont à la base de la notion de tendreté potentielle de la viande. Ces caractéristiques conditionnent d'ailleurs fortement leur valeur, le consommateur privilégiant les muscles à faibles teneurs en collagène et provenant d'animaux jeunes chez lesquels ce collagène est plus faiblement réticulé. Cette importance a justifié le très grand nombre de travaux conduits pendant près d'un siècle, sur l'étude des relations entre les caractéristiques du tissu conjonctif et la tendreté de la viande. Les résultats de ces études ont eu notamment pour conséquence une évolution des pratiques dans les systèmes de production de viande pour minimiser les variations de qualité, provenant notamment de la fraction conjonctive du tissu musculaire (essentiellement teneur et réticulation du collagène en relation avec l'âge et le profil génétique des animaux).

Les progrès effectués dans la connaissance des mécanismes à la base de la part de la dureté de la viande attribuable à la structure contractile du muscle (en relation notamment avec le degré de contraction et la maturation), permettent à présent de fortement limiter la variabilité de la tendreté liée à la fraction myofibrillaire. Ceci a eu pour conséquence d'accroître l'incidence relative du tissu conjonctif sur la variabilité de la qualité de la viande. Par ailleurs, les progrès réalisés dans la connaissance et les méthodes d'analyse de ce tissu ont ouvert de nouvelles voies d'investigation (Mc Cormick, 1994 ; Purslow, 2002 et 2005).

Le tissu conjonctif assure plusieurs rôles comme la cohésion entre les faisceaux de fibres et ainsi le maintien de la structure du muscle durant la contraction. Il sert également d'interface, afin de faciliter le glissement des faisceaux les uns par rapport aux autres. Ces propriétés mécaniques et structurelles trouvent leur origine dans les propriétés physico-chimiques des protéines qui le composent, en particulier celles du collagène. Différents

paramètres peuvent être mesurés, comme la concentration en collagène dans le muscle, sa stabilité thermique ou encore la nature et la proportion relative de chacune des isoformes présentes. Ces paramètres varient sous l'effet de différents facteurs comme l'âge, le sexe, la race, la génétique (par exemple le caractère d'hypertrophie « culard »). Néanmoins le niveau d'implication de ces facteurs dans les variations de la texture de la viande n'est pas le même selon le modèle biologique étudié (type de muscle, type d'animal) et les traitements appliqués ultérieurement à la viande.

A.1.3.1 *Le type de muscle*

La position anatomique et la fonction biomécanique des muscles ont une forte influence sur la tendreté de la viande puisque avec elles varient, notamment, les concentrations en collagène (Dransfield, 1977) et en élastine (Cross *et al.*, 1973) ainsi que la forme des faisceaux musculaires et l'organisation spatiale de la trame conjonctive (Schmitt et Dumont, 1969). Ainsi les muscles de force induisant le mouvement du squelette, comme le *Biceps femoris*, ont plus de collagène et sont moins tendres que ceux de posture comme le *Psoas major*. De même, les muscles de la partie antérieure de la carcasse sont plus riches en collagène que ceux de la partie postérieure (Browning *et al.*, 1990).

Des différences de solubilité du collagène et de diamètre des fibres de collagène existent aussi entre muscles. Chez les bovins (Light *et al.*, 1985) ou chez le poulet (Liu *et al.*, 1996), les muscles les plus tendres contiennent en général du collagène plus soluble et des fibres de collagène de plus faible diamètre. La stabilité thermique du collagène, lorsqu'elle est élevée, joue un rôle majeur lors de la phase de cuisson. Elle est principalement liée à la nature et au nombre des liaisons de réticulation qui relient les molécules adjacentes de collagène (Light, 1987).

L'organisation du périmysium, et son effet sur la capacité de déformation de la viande sous contrainte, contribuent également à la variabilité de dureté de la viande. Cette organisation variant largement d'un type de muscles à l'autre mais peu au sein d'un même muscle, semble être liée aux changements de forme du muscle lors de la contraction (Rowe, 1977). L'épaisseur du périmysium varie aussi fortement d'un muscle à l'autre, et dans le même sens que les indices de dureté. Un périmysium épais a souvent été associé à une viande dure. Des corrélations positives élevées entre l'épaisseur du périmysium secondaire et la force de cisaillement ont été observées chez des porcs d'âges différents (Fang *et al.*, 1999) et le poulet en faisant varier le type de muscle (Liu *et al.*, 1996) ($R = 0,98$ et $0,95$ respectivement). Brooks et Savell (2004) ont observé sur huit muscles différents de bovins que l'épaisseur du

pérимysium primaire peut varier d'un facteur supérieur à 2. Ils ont cependant obtenu une corrélation significative, mais faible ($R = 0,13$) entre l'épaisseur et la force de cisaillement par Warner-Bratzler. De ce fait, l'épaisseur ne semble pouvoir expliquer qu'un pourcentage limité de variation de tendreté.

Hammond (1932) fut le premier à décrire la relation entre taille de faisceaux délimités par le pérимysium et tendreté. Il a montré chez le mouton que la taille des faisceaux pouvait être multipliée par deux d'un muscle à l'autre, et a conclu que la viande la plus tendre possédait les faisceaux les plus petits et donc le grain le plus fin. Par ailleurs, Strandine *et al.* (1949) classèrent 50 muscles de bovins en fonction de la taille et de la facilité à distinguer les faisceaux. Ils observèrent que les muscles à l'intérieur d'une espèce ont des profils histologiques différents; ainsi le muscle *Pectoralis superficialis* a des faisceaux larges et distincts alors que l'*Iliacus* a une texture plus fine et uniforme (Tableau A-1). Sans pouvoir établir une corrélation quantitative, ils conclurent qu'il existait une relation générale entre le profil de répartition des faisceaux et la tendreté. Ainsi les muscles présentant de grands faisceaux délimités par un pérимysium épais sont plus durs.

Brady (1937) a aussi étudié l'organisation du tissu conjonctif et a essayé, chez le bovin, de corréler la taille des faisceaux avec la dureté de la viande. Il obtint un coefficient de corrélation de - 0.81 entre le nombre de fibres dans un faisceau et la force maximale de cisaillement. Or constatant que la taille des fibres restait constante, il conclut que la taille des faisceaux et la force de cisaillement étaient fortement reliées : plus les faisceaux étaient grands et plus la viande était tendre (Brady, 1937). Ses conclusions sont, donc, en totale opposition avec celles de Hammond (1932), qui concluait qu'un muscle avec de petits faisceaux donnait une viande tendre.

Schmitt et Dumont (1969) ont également travaillé sur des coupes histologiques de muscle, dans le but de relier l'organisation du pérимysium avec la tendreté de la viande, en mettant au point une méthode de description et d'évaluation très détaillée (Tableau A-4). Ces auteurs de même que Abustam *et al.* (1987) ont établi une relation entre la densité linéaire de la trame pérимysiale et la résistance mécanique en cisaillement et en compression de la viande crue. Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure définitivement sur l'effet de cette densité sur la tendreté de la viande, car les mesures mécaniques sur viande crue ne sont pas de prédicteurs suffisants des propriétés de la viande cuite. Totland *et al.* (1988) ont également proposé une méthode pour prendre en compte la forme des faisceaux. Ils ont montré, en accord avec Brady (1937), que des petits faisceaux non cylindriques étaient associés à de la

viande dure. Cependant ces mesures sont lourdes à mettre en oeuvre et très subjectives, et par conséquent ces mesures n'ont été réalisées que sur un nombre réduit d'échantillons.

Tableau A-4. Liste des critères pris en compte dans la méthode de Schmitt et Dumont (1969)

Fibres musculaires	Diamètre
	Densité
	Surface
	Forme
	Nombre
	Type enzymatique
Tissu conjonctif périmysial	Importance totale
	Densité
	Degré de structuration
	Structuration atypique
	Hiérarchie (distinction aisée entre les différents niveaux de trame conjonctive)
Trame primaire	Uniformité de l'épaisseur
	Epaisseur moyenne
	Nombre faisceaux principaux
	Forme faisceaux principaux
	Dimension faisceaux principaux
	Relation entre forme et dimension
	Forme des sommets
	Fréquence des nœuds
	Taille des nœuds
Trame secondaire	Homogénéité
	Finesse
	Etoiles conjonctives
Autres	Vaisseaux sanguins (nombre, taille, localisation)
	Tissu adipeux (localisation, taille, dispersion)
	Lames et taches conjonctives (répartition, importance)
	Fibres d'élastine (taille et nombre)
	Fibres de collagène (type, taille, nombre, densité)

A.1.3.2 Les facteurs intrinsèques à l'animal

De nombreux facteurs peuvent varier en ce qui concerne le type d'animal. Ainsi l'âge, le sexe ou encore la race et le type génétique des animaux peuvent influencer les caractéristiques du tissu conjonctif et par voie de conséquence la tendreté de la viande.

L'âge

De nombreux auteurs, notamment Cross *et al.* (1973), Reagan *et al.* (1976) et Kopp et Bonnet (1982), ont montré que la teneur en collagène des muscles de bovin ne variait pas

significativement avec l'âge de l'animal. Ce phénomène a été aussi observé chez d'autres espèces, comme le mouton (Young et Braggins, 1993a). Il faut cependant noter que certains auteurs (Boccard *et al.*, 1979) ont observé des variations avec l'âge de la concentration en collagène des muscles chez le bovin jeune. Dans leur étude, il a été montré que la teneur en collagène diminuait de la naissance jusqu'à l'âge de 8 mois, pour ensuite augmenter jusqu'à l'âge d'un an, période correspondant à l'arrivée à maturité sexuelle de l'animal, et enfin se stabiliser au-delà. En revanche, quelle que soit l'espèce animale considérée, la solubilité du collagène diminue régulièrement avec l'âge (Herring *et al.*, 1967a ; Reagan *et al.*, 1976 ; Young *et al.*, 1992). Cette diminution a été reliée à l'augmentation du nombre de liaisons thermostables entre les molécules adjacentes de tropocollagène (Light, 1987).

L'âge influencerait aussi l'épaisseur du périmysium qui augmenterait, du moins chez le bœuf (Nishimura *et al.*, 1999), le porc (Fang *et al.*, 1999) et le poulet (Liu *et al.*, 1994). Cet effet de l'âge serait en fait dû à une augmentation du format des animaux et donc de la taille des muscles. En effet, en comparant veaux naissants et adultes (vaches de 13 ans) et en ramenant les échantillons à la même échelle, Schmitt et Dumont (1972) ont observé une diminution avec la croissance de l'épaisseur relative du périmysium par rapport à la taille du muscle, ainsi qu'une perte de régularité des contours des faisceaux de fibres musculaires.

Hammond (1932) a observé, chez le mouton, que la taille de faisceaux augmentait avec l'âge et la taille de l'animal. Sans pouvoir établir de relation chiffrée, cet auteur a émis l'hypothèse que de petits faisceaux pouvaient être associés à une viande plus tendre. Par la suite, (Cooper *et al.*, 1968) ont établi une corrélation significative entre la taille de faisceaux et la tendreté ($R = -0,41$ pour l'analyse sensorielle et $R = 0,39$ pour la force de cisaillement) sur de la viande bovine provenant d'animaux d'âges différents.

La race

Malgré les nombreux travaux conduits sur l'effet de la race sur les caractéristiques du tissu conjonctif (teneur en collagène, solubilité et distribution du réseau), celui-ci reste discuté. Boccard *et al.* (1979) ont observé une différence de teneur en collagène et de solubilité entre les muscles de bovins de races Afrikaner et Friesland. Les animaux Friesland sont plus riches en collagène jusqu'à l'âge de 8 mois puis la tendance s'inverse. Les animaux Afrikaner ont par contre un collagène plus soluble. Berge *et al.* (2001) ont aussi rapporté une teneur en collagène total significativement plus élevée dans le muscle de bovin Holstein comparée à celui de race Salers. De plus Berge *et al.* (1997) travaillant sur trois types bovins (Angus × Hereford, Piemontese × Hereford, Brahman) ont noté une différence de teneur en

collagène mais n'ont pu observer que peu d'influence de la race sur la solubilité du collagène et sur la nature des cross-links dans cette protéine.

L'effet propre de la race sur l'organisation du réseau conjonctif n'a pratiquement pas été étudié. Seul Norman (1982) a comparé le *Bos indicus* (zébus) au *Bos taurus* et a remarqué que les zébus avaient un réseau conjonctif périmysial plus dense que les bovins de race Charolaise. D'autre part, (Dumont et Schmitt, 1973) ont comparé la hiérarchisation de la trame conjonctive sur des animaux de types génétiques différents (culard ou non) et ils l'ont associé à des différences de tendreté. Ainsi les muscles des animaux au phénotype culard présentaient des réseaux de tissu conjonctif plus fins et moins hiérarchisés.

Le sexe

Boccard *et al.* (1979) ont également étudié l'effet de la castration sur la teneur en collagène et ils ont montré que les muscles des mâles entiers contenaient plus de collagène que ceux des bœufs. Young *et al.* (1993b) ont mis en évidence une augmentation de la synthèse de collagène au moment de la puberté chez les moutons. On peut donc penser que la sécrétion des hormones sexuelles joue un rôle important dans la synthèse du collagène, notamment au moment de la puberté (Kopp et Bonnet, 1982).

En revanche, aucune étude n'a comparé la répartition du tissu conjonctif dans les muscles d'animaux de sexe différents. Le caractère constitutif de l'architecture du réseau conjonctif, fortement liée à la fonction du muscle ne devrait cependant pas être influencé par le sexe de l'animal.

A.1.3.3 Les facteurs extrinsèques

Les processus biologiques et technologiques, que la viande subît après abattage, la maturation puis la cuisson pour la consommation, influencent également les propriétés mécaniques du tissu conjonctif. Néanmoins ces facteurs technologiques peuvent être contrôlés contrairement aux facteurs biologiques cités précédemment.

La maturation

Après l'abattage de l'animal, le phénomène dit de maturation, permet l'attendrissage progressif de la viande, grâce à l'action des protéases qui dégradent les protéines myofibrillaires. La question, que se sont posés de nombreux auteurs, est alors de savoir si les protéines du tissu conjonctif subissent un phénomène similaire pendant cette phase. Plusieurs équipes n'ont pas trouvé d'augmentation de la solubilité du collagène pour des temps de

maturation variant d'1 heure à 20 jours (Jeremiah et Martin, 1981), de 1 à 18 jours (Silva *et al.*, 1999), ou de 0 à 35 jours (Harris *et al.*, 1992).

Cependant d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation significative de la solubilité du collagène après 14 jours de maturation (Stanton et Light, 1987 ; Lewis *et al.*, 1991). Il a été mis en évidence qu'à 24 heures *post mortem* la température de début de contraction du collagène pouvait chuter de 1,5°C (McClain *et al.*, 1970). De plus, après 7 à 10 jours de maturation, la courbe de dénaturation thermique du collagène est décalée de 5 à 8°C à cause de modifications dans les glucosaminoglycanes associés au collagène (Greaser, 1997). L'organisation des molécules du tissu conjonctif chez le bovin ne subirait que des changements minimes jusqu'à 10 jours *post mortem*, alors qu'elle évoluerait nettement après 14 jours de conservation à 4°C (Nishimura *et al.*, 1998).

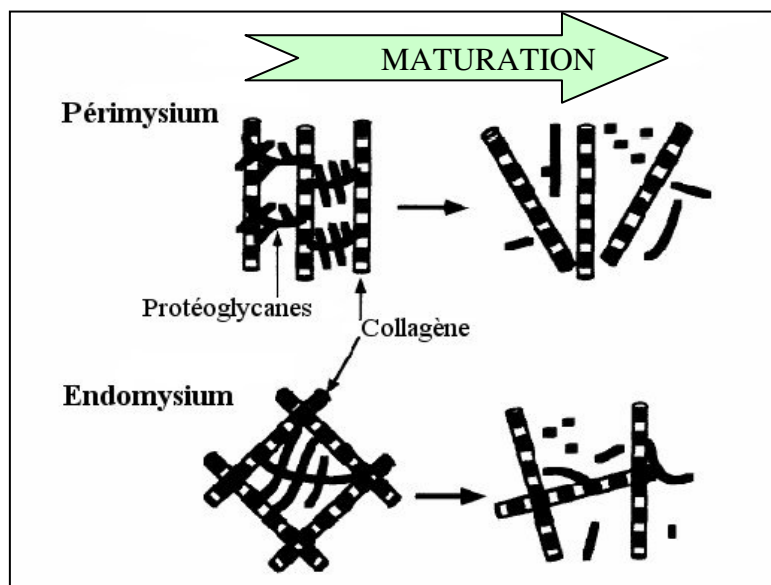


Figure A-7. Représentation schématique de l'évolution des protéoglycanes dans le muscle bovin durant la maturation *post mortem*. (Nishimura *et al.*, 1996)

Après 7 jours *post mortem*, le taux de protéoglycanes de haut poids moléculaire extraits du muscle de bovin est presque nul (Nishimura *et al.*, 1998). En effet, la décorine est dégradée chez le bovin après 21 jours *post mortem* (Eggen *et al.*, 1998), entraînant la désorganisation de la structure du tissu conjonctif intramusculaire. Dans le muscle immédiatement *post mortem*, les protéoglycanes relient les fibrilles de collagène et stabilise le réseau de l'endomysium et les fibres de collagène du périmysium. Dans le muscle mûri, les protéoglycanes sont dégradés, la liaison entre les fibrilles de collagène est affaiblie et les fibrilles et fibres de collagène se séparent de l'endomysium et du périmysium respectivement. (Nishimura *et al.*, 1996) (Figure A-7). En effet, Suzuki *et al.* (1998) ont observé une déformation de la structure en « nid d'abeille » de l'endomysium et du périmysium chez les bovins après 21 jours *post mortem*. A 28 jours *post mortem* chez le bovin, les protéoglycanes

de la lame basale ont disparu ainsi qu'une grande partie de ceux associés aux fibrilles de collagène (Nishimura *et al.*, 1996).

En conclusion, si le tissu conjonctif est globalement une structure stable durant au moins les deux premières semaines de maturation, il n'en subit pas moins un certain nombre de modifications. La déstructuration du tissu conjonctif est principalement due à la dégradation des molécules entourant le collagène qui, lui, ne subit que de légères modifications. Le tissu conjonctif pourrait donc impliqué dans les mécanismes d'attendrissage de la viande en cas de maturation très prolongée mais certainement pas dans la limite des durées usuelles de maturation. De plus, même si la résistance mécanique du perimysium isolé chute après 14 jours *post mortem* de maturation de la viande, après chauffage à une température supérieure à 50°C, il n'est plus possible de mettre en évidence de différences de résistance mécanique entre le pérимysium extrait avant et après maturation (Lewis *et al.*, 1991).

La cuisson

Le chauffage de la viande avant consommation modifie profondément ses propriétés mécaniques et influe directement sur la tendreté. Les composantes myofibrillaires et conjonctives du muscle subissent en effet d'importantes altérations ayant des effets antagonistes sur leur comportement mécanique, tout au moins au-delà de la température de 60°C : la structure myofibrillaire devient plus dure alors que la résistance du tissu conjonctif diminue très sensiblement.

La contribution du tissu conjonctif à la résistance mécanique de la viande après cuisson est d'autant plus faible que le collagène est moins réticulé et donc plus soluble et que la température de cuisson augmente (Dransfield, 1977). En effet, entre 60 et 70°C une grande partie du collagène est dénaturée (Martens *et al.*, 1982), alors que l'élastine et la lame basale, correspondant à l'endomysium, restent stable jusqu'à 100°C (Rowe, 1986).

Par ailleurs, de fortes interactions entre structures s'établissent au-delà de 65°C, suite à la forte contraction des fibres de collagène. Cette contraction provoque des changements de structure et une compression des faisceaux de fibres. Elle contribue ainsi à augmenter les pertes d'eau déjà amorcées par la dénaturation de certaines protéines myofibrillaires intervenant à des températures plus basses (Light *et al.*, 1985). Par conséquent la contraction du collagène accroît le durcissement de la viande, lié à la dénaturation des protéines myofibrillaires pendant la cuisson.

A.1.4 Conclusion

Le caractère composite du muscle, ainsi que les différents facteurs biologiques et technologiques intervenant sur les propriétés des constituants et les caractéristiques de la viande font de la tendreté une variable multidimensionnelle complexe à étudier et difficile à mesurer. En raison des interactions nombreuses entre ces facteurs, la manière la plus rigoureuse de procéder consiste à étudier d'abord l'influence de chaque facteur séparément. Tout d'abord l'étude doit porter soit sur les myofibres, soit sur le tissu conjonctif. De ce fait pour étudier ce dernier, il faut pouvoir s'affranchir de l'influence des fibres musculaires en travaillant par exemple sur de la viande très maturée. Il faut donc maîtriser les paramètres technologiques (maturation, cuisson) de manière à pouvoir s'affranchir de l'influence de ceux-ci. Ensuite il faut définir le facteur de variabilité de la tendreté à prendre en compte parmi les facteurs biologiques. Le facteur « type de muscle » apparaît comme celui qui génère le plus de variabilité à la fois dans l'organisation du réseau conjonctif et dans la tendreté de la viande.

Par ailleurs, beaucoup d'études ont porté sur la teneur en collagène et sa stabilité thermique, sans expliquer totalement la variabilité de la tendreté liée au tissu conjonctif. Par conséquent, nous avons choisi de nous intéresser principalement à l'organisation de ce dernier, poursuivant les études anciennes et limitées faute d'outils d'analyse adaptés. Dans ce but, il a été nécessaire de mettre au point une technique efficace et validée permettant de caractériser la distribution spatiale du tissu conjonctif à ses différents niveaux d'organisation.

A.2 ANALYSE D'IMAGES

L'imagerie est à la base des méthodes utilisées pour étudier l'organisation du tissu conjonctif et obtenir les données qualitatives ou quantitatives sur celle-ci. Le processus se divise en plusieurs étapes : d'abord l'acquisition de l'image, ensuite le prétraitement, puis la segmentation et enfin la collecte proprement dite de l'information réalisée en mesurant les objets segmentés (Figure A-8).

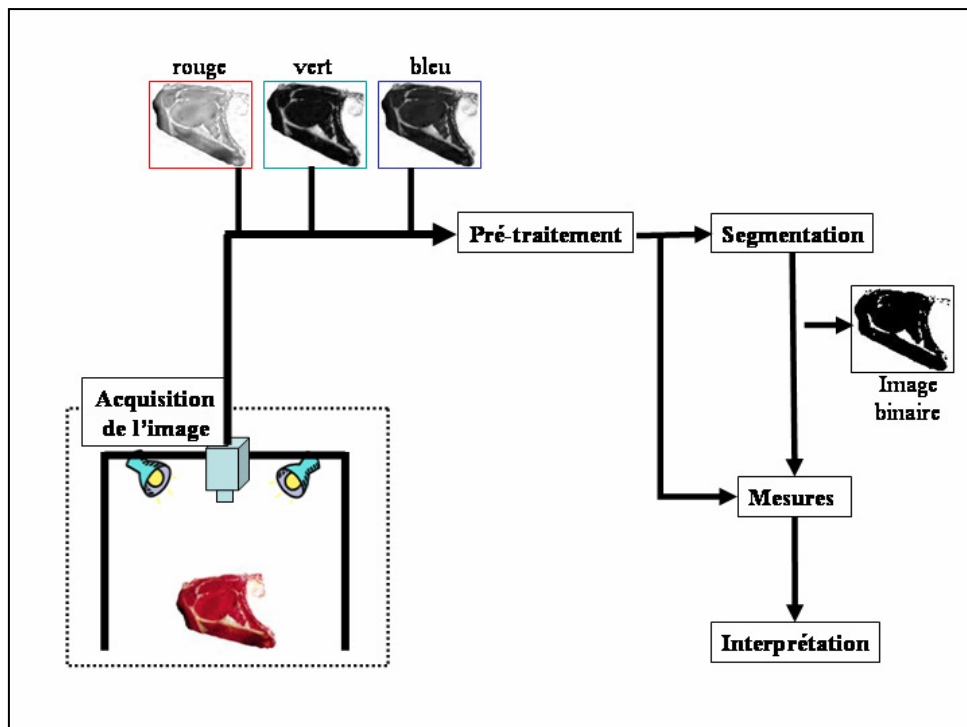


Figure A-8. De l'acquisition à l'extraction d'indices quantitatifs. D'après Mery et Pedreschi, 2005.

A.2.1 Modalités d'imagerie

Comme cela était décrit précédemment, le tissu conjonctif intramusculaire s'organise en plusieurs niveaux, mettant en jeu des structures dont la taille varie du dixième de micromètre à quelques millimètres. Leur observation requiert des résolutions spatiales et des champs de vue très différents, que ne peut fournir une seule modalité d'imagerie. Deux échelles principales peuvent être définies : la microscopie et la macroscopie.

A.2.1.1 Microscopie

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : le microscope électronique qui utilise des électrons

pour étudier l'objet et le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons.

Microscopie électronique

La microscopie électronique a été utilisée dans l'étude du tissu conjonctif pour décrire notamment les effets sur son ultrastructure de la maturation (Nishimura *et al.*, 1998 ; Nishimura *et al.*, 1996 ; Nishimura *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1995), ou encore des dépôts de gras (Nishimura *et al.*, 1999). Elle a également permis de mesurer le diamètre des fibres de collagène et de terminer son influence sur la texture de la viande (Rowe, 1978 ; Light *et al.*, 1985).

Microscopie optique

La microscopie optique est utilisée pour l'étude des tissus, d'où le nom de la discipline qui en découle : l'histologie. Les tissus peuvent être observés sous différents rayonnements, définissant plusieurs techniques de microscopie optique : tout le spectre de la lumière blanche pour la microscopie visible ou encore seulement quelques longueurs d'onde pour la microscopie en fluorescence et la microscopie confocale.

La microscopie visible requiert une coloration des échantillons spécifique du composé à mettre en évidence. Par exemple, le rouge Sirius est utilisé pour observer le collagène (Flint et Pickering, 1984), l'huile rouge pour les lipides ou encore l'orcéine pour l'élastine et le bleu Alcian pour les protéoglycannes (Bancroft et Stevens, 1990). Cette technique de coloration permet d'observer des coupes de tissus dans des champs allant jusqu'au centimètre, permettant l'observation des fibres musculaires et des faisceaux de fibres primaires. Elle permet même la quantification du collagène sur les coupes de tissus musculaires (Lopez De Leon et Rojkind, 1985).

La microscopie en fluorescence ou confocale implique que le composé à observer émette un rayonnement après excitation avec une longueur d'onde spécifique (fluorescence). Mis à part le collagène et l'élastine qui ont des propriétés de fluorescence naturelle, la plupart du temps l'échantillon est marqué à l'aide d'anticorps spécifique couplé à une sonde fluorescente. Cette technique plus résolutive permet de localiser les différents composés du tissu conjonctif. Ainsi les différents types de collagène présents dans le muscle ont pu être mis en évidence (Listrat *et al.*, 1998 ; Listrat *et al.*, 2000).

A.2.1.2 Macroscopie

Pour étudier l'organisation du tissu conjonctif dans des champs de vue plus larges (supérieurs au centimètre), d'autres modalités d'imagerie doivent être mises en œuvre. La plus simple reprend les techniques de la microscopie optique sur des échantillons plus grands. D'autres modalités d'imagerie plus complexes sont basés sur les propriétés physiques du tissu, comme l'imagerie par résonance magnétique nucléaire et l'échographie.

Imagerie macroscopique

La structure du muscle et du tissu conjonctif a été examinée en macroscopie à partir de tranches de muscle soit en réflexion sous lumière visible (Li *et al.*, 1999 ; Basset *et al.*, 2000 ; Lu et Tan, 2004), soit en fluorescence sous lumière ultraviolette (Basset *et al.*, 2000) ou sous un rayonnement de quelques longueurs d'onde précises (Skjervold *et al.*, 2003). L'avantage de cette méthode réside dans sa simplicité qui permet de l'utiliser en routine sur une ligne de découpe en abattoir, par exemple.

Imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'imagerie RMN, non destructive et non invasive permet de travailler sur des muscles entiers, contrairement aux techniques histologiques. Un grand nombre de techniques d'imagerie permettent de visualiser sélectivement le gras. Elles sont fondées sur la différence de temps de relaxation T1 et/ou de fréquences de résonance entre les protons du gras et ceux de l'eau (Kaldoudi et Williams, 1992). Si le champ magnétique élevé permet d'augmenter le contraste fréquentiel entre eau et gras, il induit aussi une augmentation du rapport signal sur bruit (RSB). Cette dernière a été mise à profit pour mettre en évidence la distribution du gras intramusculaire en augmentant la résolution spatiale (Laurent *et al.*, 2000). D'autre part, une autre méthode dite pondérée de susceptibilité, sensible aux variations de champ magnétique, met en évidence plus généralement le tissu conjonctif, comprenant à la fois les lipides et le collagène. Cette technique a été utilisée par Bonny *et al.* (2000) pour étudier la structure de différents types de muscles de bovin. Les différences de champ magnétique sont induites par les différences de susceptibilité magnétique entre l'eau des myofibres et le tissu conjonctif. Pourtant, le réseau conjonctif non gras étant un tissu composite (différents types de collagène, élastine, protéoglycannes) il est difficile de savoir si toutes ces molécules sont détectables par ce principe. Cette analyse est envisageable en réalisant le marquage immuno-histologique de ces molécules sur des coupes d'échantillons préalablement visualisés en IRM pondérées en susceptibilité. Ceci sera abordé dans la partie F de ce manuscrit.

Méthodes ultrasonores

Les méthodes ultrasonores sont également utilisées dans le secteur de l'industrie des viandes pour déterminer l'épaisseur de gras sous-cutané (Perkins *et al.*, 1992), pour caractériser les muscles selon le type musculaire, l'âge de l'animal et la castration (Abouelkaram *et al.*, 2000) ou pour déterminer la composition corporelle des carcasses (Miles *et al.*, 1987). Deux modes d'exploitation sont utilisés : le mode A génère un signal temporel exploité sous différentes formes (vitesse, atténuation, intensité rétrodiffusée) et le mode B génère une image. Ces méthodes reposent sur la mesure de la vitesse de propagation des ultrasons qui est variable selon la nature et la composition du milieu qu'ils traversent, notamment la teneur en gras. Par ailleurs, lorsque la vague incidente d'ultrasons rencontre des modifications locales de densité ou d'élasticité au sein du muscle liées à des structures de taille équivalente à la longueur d'onde, le signal est diffusé dans toutes les directions et les images présentent une granulosité appelé « speckle ». L'analyse statistique de ces « speckles » a été utilisée pour déterminer la teneur et la distribution du gras intramusculaire et détecter le tissu conjonctif. La méthode ultrasonore a l'avantage d'être, comme l'IRM non destructive et non invasive, et peut être utilisée pour classer les muscles d'après leur teneur en gras (Kim *et al.*, 1998). Cependant, elle reste bien moins précise que l'analyse directe du réseau conjonctif et elle ne permet pas de distinguer le gras du collagène, deux constituants qui ont pourtant des effets opposés sur la texture de la viande. De plus il est difficile de dissocier les effets dus à la composition et ceux dus à la structure anisotrope du muscle (Abouelkaram *et al.*, 2000).

A.2.2 Traitement et analyse d'images

Quelle que soit la modalité employée, l'objectif est de pouvoir quantifier des indices permettant de caractériser la structure du muscle délimitée par le réseau de tissu conjonctif. Deux approches sont possibles. La première approche ne requiert pas de segmentation préalable. Elle s'effectue sans identification donc sans étiquetage de la structure à étudier. La seconde approche est basée sur la segmentation qui permet d'identifier et d'étiqueter des classes tissulaires. Elle permet notamment le calcul d'indices morphologiques caractérisant les différents ensembles segmentés.

A.2.2.1 Obtention de primitives sans segmentation : l'analyse de texture d'image

Les méthodes d'analyse ne demandant pas d'extraction préalable de l'objet à étudier sont utilisées pour étudier la texture des images, en mettant l'accent sur les relations entre les

pixels. Elles cherchent à trouver le rapport entre le contenu de l'image et la répartition locale des niveaux de gris. De nombreuses méthodes permettent l'étude de la texture. En effet, la texture d'une image peut être définie comme une région homogène pour une propriété spatiale ou fréquentielle. De cette définition, découlent trois classes de méthodes. Les premières méthodes utilisent les propriétés spatiales de l'image, sous la forme de matrice de dépendance des niveaux de gris (généralisation des matrices de co-occurrence (Haralick *et al.*, 1973)), et de matrice de longueur de plage (Galloway, 1975). La deuxième classe utilise les propriétés fréquentielles extraites du spectre d'énergie de Fourier (Matsuyama *et al.*, 1980). Les dernières combinent les propriétés spatiales et fréquentielles, comme la décomposition multi échelles basée sur les fonctions d'ondelettes (Salari et Ling, 1995).

A partir d'un grand nombre de paramètres de texture sur un même échantillon, on possède une méthode efficace pour la classification. Ainsi l'analyse de texture a été utilisée pour classer des coupes de muscles, observées en lumières visible et ultraviolette, en fonction du type de muscle, de la race ou encore de l'âge de l'animal (Basset *et al.*, 2000), en fonction du persillé en lumière visible (Li *et al.*, 2001 ; Shiranita *et al.*, 1998), ou en différentes classes de tendreté en lumière visible (Tan, 2004). Les indices de texture ont également été utilisés pour prédire la tendreté de la viande (Li *et al.*, 1999), mais les modèles obtenus n'expliquaient qu'une part faible des variations de la tendreté ($R^2 = 0,30$). En étudiant séparément les différents facteurs influençant la tendreté (type de muscle, race, âge) Basset *et al.* (Basset *et al.*, 2000) ont obtenu des modèles ayant des coefficients de détermination plus élevés. Cependant les modèles étaient basés sur des effectifs limités, laissant douter de la robustesse des modèles obtenus. Les méthodes d'analyse de texture semblent être donc plus efficaces pour la classification que pour la prédiction de la tendreté de la viande. De plus il est difficile d'établir un lien biologique cognitif entre des paramètres statistiques (moments, corrélation, variance, entropie) et les structures tissulaires.

A.2.2.2 Obtention de primitives après segmentation

Une autre approche consiste à calculer des paramètres, le plus souvent morphologiques, après l'extraction préliminaire de l'objet par segmentation. Il s'agit d'une étape déterminante dans le processus de traitement des images, qui consiste à subdiviser l'image en plusieurs classes de constituants. En effet, les objets étant étiquetés elle permet d'en extraire des paramètres morphologiques, qui peuvent être très généraux (surface) ou plus spécifiques du modèle de l'objet obtenu, comme par exemple le diamètre pour un objet circulaire ou la longueur pour un réseau. Cependant le problème majeur de la segmentation reste son

automatisation (sans intervention humaine) et la validation de la méthode employée (Zhang, 1997).

Il existe un très grand nombre de méthodes de segmentation et donc plusieurs manières de les classer. Une première classification consiste à opposer les méthodes génériques aux méthodes dédiées. Une deuxième approche sépare les méthodes « frontière » et les méthodes « régions ». Une troisième distingue les approches « modèles » ou « top-down », des approches « pixels », ou « voxels » en trois dimensions, autrement appelées « bottom-up ».

La séparation entre méthodes génériques et dédiées semble peu appropriée. En effet l'algorithme universel n'existe pas. S'il existe des approches relativement génériques (seuillage, modèles déformables), elles demandent à être adaptées au contexte pour obtenir un résultat optimal. Il en résulte autant de méthodes de segmentation que d'objets à segmenter et réduisant très vite le champ d'action de chaque d'elles.

Approches régions et frontières

Les approches régions reposent sur un critère de ressemblance locale. Elles se distinguent en deux groupes : les méthodes « growing and merging » et les méthodes « splitting and merging ». La première est une méthode ascendante qui groupe les pixels ou les sous-régions en régions plus grandes en fonction de critères d'homogénéité. La seconde est une méthode descendante et divise l'image en régions de plus en plus petites de manière à satisfaire le ou les critères fixés (Du et Sun, 2004). Ces approches permettent d'utiliser simultanément plusieurs propriétés de l'image. Elles garantissent par définition la segmentation de régions cohérentes. Cependant elles demandent des connaissances a priori fortes sur les objets à segmenter afin d'établir le critère de ressemblance. L'algorithme de « ligne de partage des eaux » ou dit « des bassins versants » (watershed) est un exemple de méthode région.

Les approches frontières reposent sur la segmentation des objets par leurs contours. Un contour se définit comme la zone de variation rapide d'une ou de plusieurs caractéristiques de l'image. Des exemples de cette méthode sont des filtres passe-haut utilisant soit la dérivée première de l'image (gradient), soit la dérivée seconde (laplacien). Le filtre gradient recherche le maximum du gradient dans la direction du vecteur gradient (Canny, 1986). Le filtre laplacien recherche le passage à zéro de la dérivée seconde (Haralick, 1984). Les principales difficultés de ces méthodes sont la sensibilité au bruit et la nécessité de fermer des contours détectés de manière morcelée.

Approches « modèles » ou « top-down »

Ces approches se découpent en trois étapes. Tout d'abord il faut concevoir un modèle de l'objet à segmenter en tenant compte de ses invariants. Ceci nécessite une forte connaissance a priori de l'objet. Puis la deuxième étape consiste à initialiser le modèle à partir d'une détection de contours afin dans un troisième temps de l'ajuster à l'objet. L'exemple principal attaché à ces méthodes est la méthode des modèles déformables ou encore appelée « contours actifs » (Kass *et al.*, 1987). Il s'agit d'un contour fermé soumis à des contraintes de régularité et d'élasticité fixées par l'utilisateur. Il converge vers un potentiel attaché le plus souvent aux contours sous l'action d'une force externe ou interne.

Approches « pixels » ou « bottom-up »

Ces méthodes consistent à calculer des attributs de bas niveau et de les fusionner ensuite pour séparer des régions de l'image. De cette manière, on réalise de l'agrégation d'information qui peut être de plusieurs natures : intensité, position, forme ou encore mouvement et qui intègre des connaissances a priori de l'objet à segmenter. Si l'extraction de primitives est souvent simple à réaliser, la seconde étape d'agrégation est plus complexe et se fonde sur des techniques de classification. On peut citer la classification bayésienne non contextuelle (Beisner, 1968), markovienne (Haralick, 1975), k plus proches voisins (Clarke *et al.*, 1993), par partitionnement (c moyennes floues ou FCM (Bezdek, 1981)).

Le seuillage est la plus simple des méthodes « bottom-up », l'attribut bas niveau extrait étant l'intensité des pixels. Le seuillage est particulièrement efficace pour des images présentant un fort contraste c'est-à-dire permettant de distinguer aisément les objets du fond (Du et Sun, 2004) en raison de la simplicité de la méthode de classification : les pixels de niveau supérieur à une valeur (seuil) appartiennent à une classe (objet) et ceux inférieurs à l'autre (fond). Si le même seuil est appliqué à toute l'image, on parle alors de seuillage global. Si l'information contextuelle locale est utilisée afin de faire varier la valeur du seuil, alors un seuillage local est appliqué. En effet, le contraste peut fortement varier dans certaines images, notamment en raison des conditions d'acquisition (par exemple, l'éclairage) ou pour des raisons intrinsèques liées à la méthode de révélation de l'objet (par exemple, des différences de concentration de colorant en histologie traduisant la taille ou la nature de l'objet). Dans le cas où ces variations de contraste ne peuvent être corrigées par un prétraitement des images (Likar et Viergever, 2000), les seuillages locaux sont préconisés.

Afin de s'adapter parfaitement au contexte, il faut pouvoir déterminer le seuil de l'image à appliquer de manière automatique et validée, de manière à obtenir une segmentation

optimale quelle que soit l'image. De nombreuses règles ont été proposées pour déterminer automatiquement la valeur de seuillage d'une image (Sankur et Sezgin, 2001), mais les seuillages basés sur l'histogramme restent les plus utilisés. L'algorithme d'Otsu (1979) est une méthode de seuillage automatique très classiquement utilisée, grâce à sa simplicité, sa stabilité. Il cherche à maximiser la séparation entre les deux modes représentés par les objets par le biais de la variance inter-classes. Cependant lorsque l'histogramme est unimodal, comme c'est le cas pour les images de muscles, cet algorithme ne peut pas s'appliquer. Rosin (2001) a donc mis au point une méthode, elle aussi basée sur l'histogramme, dédiée au cas unimodal et qui recherche la courbure maximale de l'histogramme.

A.2.3 Analyse d'images appliquée à la caractérisation des viandes

L'application des techniques d'acquisition et de traitement des images dans le domaine de l'étude des produits carnés a commencé vers la fin des années 1990 (Du et Sun, 2004). Or la plupart des études portant sur l'organisation du tissu conjonctif et ses implications sur la tendreté de la viande sont antérieures aux années 1980, et n'ont donc pas utilisé la plupart de ces méthodes. Elles se sont limitées à caractériser l'architecture du réseau conjonctif en mesurant manuellement l'épaisseur du périmysium et la taille des faisceaux qu'il délimite en utilisant les techniques de microscopie.

Dans le domaine des technologies de la viande, la segmentation a principalement été utilisée pour classer les carcasses bovines selon différentes classes de qualité et de rendement (Cannell *et al.*, 1999 ; Karnuah *et al.*, 2001), ou quantifier la distribution du gras intramusculaire (Newman, 1984 ; Kuchida *et al.*, 2000 ; Tan, 2004 ; Faucitano *et al.*, 2005) (Collewet *et al.*, 2005). La plupart de ces travaux se sont appuyés sur des méthodes « bottom-up » utilisant soit le seuillage manuel (Faucitano *et al.*, 2005) ou automatique (Kuchida *et al.*, 2000 ; Collewet *et al.*, 2005) soit des méthodes de classification (Laurent, 2000 ; Lu et Tan, 2004).

Collewet (2005) a mis au point une méthode de prédiction de la masse maigre des carcasses de porc par IRM. Les images obtenues étaient seuillées selon l'algorithme d'Otsu de manière à segmenter les voxels correspondant aux lipides et à les quantifier. Cette surface détectée a pu ensuite être reliée à la masse grasse effective des carcasses déterminée par dissection, afin de paramétrer des modèles de prédiction.

Laurent (2000) a effectué la segmentation des différentes composantes du muscle (fibres musculaires, gras, tissu conjonctif, eau libre) à partir d'images en RMN par la méthode FCM. Lu et Tan (2004) ont étiqueté les pixels d'images couleur de côtes de boeuf selon les trois

catégories (maigre, gras et os). L'algorithme utilisait la distance de Mahalanobis comme critère de classification des pixels. Ainsi ils pouvaient prédire le pourcentage de maigre de la carcasse.

A.3 CONCLUSION

Notre objectif était de caractériser l'organisation du tissu conjonctif intramusculaire, à l'aide de paramètres possédant une signification biologique. Ainsi l'analyse de la texture d'image a dû être écartée. Le choix de la méthode de segmentation a été dirigé par les caractéristiques de nos images, et notamment du tissu conjonctif. Ne possédant pas de modèle fiable de l'objet à segmenter, le choix se réduisant aux approches « bottom-up ». De plus ne souhaitant prendre aucun a priori sur la forme et la position du tissu conjonctif, le seuillage était la méthode la plus adaptée. Malgré l'existence d'autres techniques de traitement plus complexes (approche fractale, par exemple), nous avons choisi une méthode simple, préconisée pour des images à fort contraste comme les nôtres. En revanche, notre méthode de seuillage devait être adaptative, optimisée et validée.

B. MATERIELS ET METHODES

L'étude s'est décomposée en deux parties. La première, portant sur un nombre réduit d'animaux, a permis de fixer les conditions expérimentales (nombre de muscles et barème de cuisson) pour le reste de l'étude et de mettre au point les outils d'analyse (traitement des images et mesures de la texture). La deuxième réalisée sur un plus grand nombre d'échantillons a constitué l'étude de l'influence de l'organisation spatiale du tissu conjonctif intramusculaire sur la tendreté de la viande

B.1 ETUDE PRELIMINAIRE

B.1.1 Echantillons de muscle

Six muscles, *Biceps femoris* (BF), *Gastrocnemius* (GT), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT), *Pectoralis profundus* (PP), *Rectus femoris* (RF), ont été choisis pour leur différence de tendreté et de teneur en collagène ainsi que pour les architectures contrastées de leur tissu conjonctif, caractérisées par la taille des faisceaux de fibres musculaires, et l'épaisseur et la hiérarchisation de leur trame (Figure B-1). La position de ces muscles sur la carcasse est rappelée en annexe. Les échantillons de muscle ont été prélevés sur quatre vaches de race Aubrac, âgées de 17 à 27 mois, issues du circuit commercial traditionnel. La connaissance précise de la provenance des échantillons a permis de s'affranchir de l'influence de multiples facteurs comme l'âge, la race, le sexe des animaux ou les conditions d'abattage. Les échantillons prélevés à 48 h *post mortem* ont été conservés à 4°C pendant 8 jours *post mortem* avant d'être congelés à -20°C, emballés sous vide, jusqu'au jour de l'analyse.

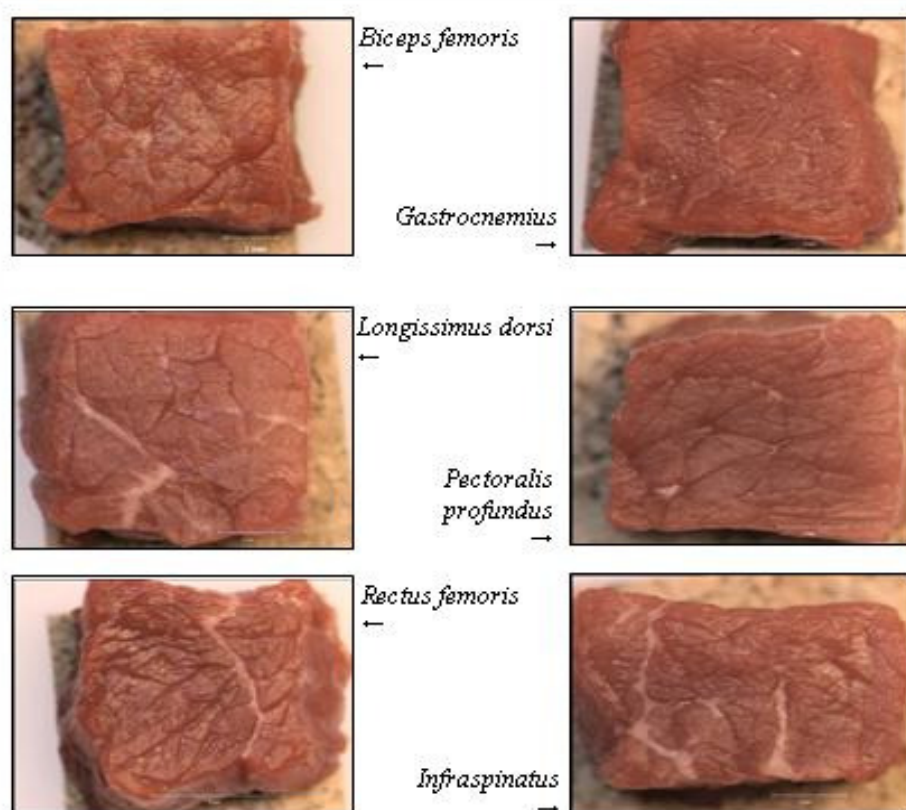


Figure B-1. Photographies de morceaux des six muscles étudiés (environ 2 cm de côté), coupés transversalement par rapport à l'axe des fibres musculaires. Le grain de la viande, dessiné par les faisceaux de fibres musculaires, est fortement dépendant du type de muscle considéré.

B.1.2 Evaluation de la texture

B.1.2.1 Contrôle de l'état de contraction et de maturation

Tests de compression de la viande crue à 20% et 80% de déformation

Le contrôle de l'état de maturation des muscles a été réalisé selon le protocole défini par Lepetit et Buffière (1993). Chaque tranche de muscle a été découpée de manière à obtenir dix éprouvettes d'environ 1 cm² de section transversale et 3 cm de long. Pour être en configuration longitudinale, la longueur de l'éprouvette devait être parallèle à l'axe principal des fibres musculaires. Les tests ont été réalisés à l'aide d'une machine à essai universelle (INSTRON, modèle 4501), équipée d'une cellule fixe munie de deux parois latérales verticales et d'un piston mobile (surface 10 × 10 mm) se déplaçant à la vitesse linéaire de 50 mm.min⁻¹ (Lepetit et Culioli, 1994) (Figure B-2). La compression a été réalisée, sur des échantillons de viande crue, perpendiculairement aux fibres musculaires. La contrainte (C20, N/cm²), déterminée à 20% de la déformation, était caractéristique de l'état d'avancement de la maturation des muscles.

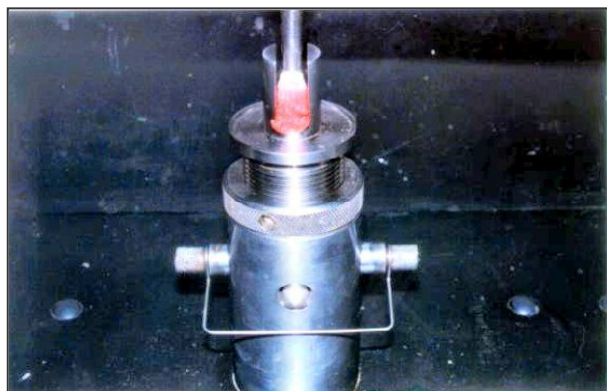


Figure B-2. Cellule de compression en configuration longitudinale installée sur une machine d'essais INSTRON 4501

Mesure de longueur de sarcomère

Cette mesure avait pour but de vérifier si les muscles étudiés n'avaient pas subi de contraction au froid, ou à l'opposé d'étirement accidentel suite à des manipulations inadaptées, lors de l'abattage des animaux et de la réfrigération des carcasses.

Les prélèvements de muscle (8 jours post mortem) ont été broyés dans un tampon contenant 0,25 M de KCl, 0,29 M d'acide orthoborique et 0,005 M d'EDTA, selon le protocole de Cross et al. (1981), mais sans glutaraldéhyde. Une goutte de broyat était ensuite montée entre lame et lamelle, afin d'effectuer la mesure sous microscope optique équipé d'un objectif à immersion (x 125). Une succession de bandes claires et sombres est apparue à l'objectif 125 (Figure B-3).

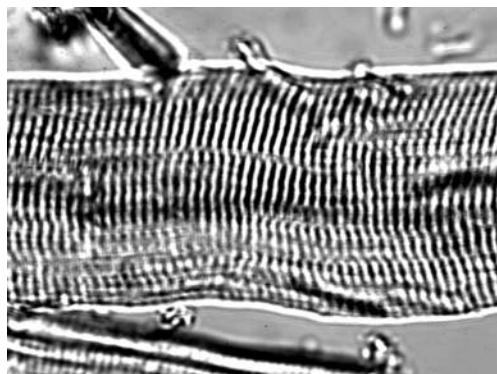


Figure B-3. Fibre musculaire striée observée avec un microscope équipé d'un objectif à immersion de grossissement $\times 125$. La distance entre deux bandes sombres successives définit la longueur du sarcomère.

Les images de ces structures fibrillaires, acquises grâce au système d'acquisition présenté plus loin (chap. B.1.3.4), ont été traitées à l'aide du logiciel Visilog 5.4 (Noesis, Courtaboeuf, France). Ce logiciel dispose d'un outil permettant de visualiser les niveaux de gris tout le long d'un segment, sous la forme d'une succession de pics caractéristiques de la striation de la fibre. La distance moyenne entre deux bandes sombres, correspondant à la longueur moyenne des sarcomères, a pu alors être évaluée en mesurant la taille du segment et en dénombrant le nombre de pics. Une méthode similaire, mettant en œuvre les outils d'analyse d'images, a été déjà décrite par Torrescano et al. (2003). Dans la plupart des cas, l'échantillon utilisé pour cette mesure était fixé avec du glutaraldéhyde (Cross et al., 1981) afin de s'assurer que l'échantillon n'évoluait pas dans le temps. Ce fixateur, agent chimique très toxique, n'a pas été utilisé dans la présente étude, de même que dans celle de Herring et al. (1967c).

B.1.2.2 Résistance mécanique de la viande cuite

La cuisson

Les tranches de muscle étaient décongelées, pendant une nuit à la température de 4°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Elles étaient ensuite immergées dans un bain-marie, de température initiale 20°C . Un préchauffage rapide jusqu'à 60°C était alors obtenu en plaçant le bain-marie dans un four à micro-ondes (durée : 10 ± 1 min). Cette étape avait pour but de faire monter la température le plus rapidement possible et de façon homogène dans la totalité de la masse de la tranche. Les tranches étaient ensuite transférées et maintenues pendant 15 ou 30 min dans un second bain-marie porté à la température de 65°C . Cette température a été choisie car elle représente la température moyenne de cuisson rapide de la viande bovine en France. Après refroidissement dans un bain d'eau maintenu à 15°C , les tranches étaient laissées à température ambiante jusqu'à l'équilibre, puis déconditionnées et découpées en éprouvette pour la mesure de la résistance mécanique.

Les tests de cisaillement

Dix éprouvettes de 1 cm² de section transversale et de 1 à 1,5 cm de longueur ont été découpées par tranche de viande cuite, la longueur étant parallèle à l'axe des fibres musculaires. Le test a été réalisé à l'aide de la cellule de cisaillement conçue par Salé (1980), équipée d'un couteau de 2 mm d'épaisseur et installée sur une machine d'essais INSTRON 4501 (Figure B-4). Le cisaillement a été réalisé à la vitesse de 60 mm.min⁻¹ selon la méthode mise au point par Lepetit et Culioli (1994). La force maximale atteinte et l'énergie à la rupture des éprouvettes ont été mesurées. Sur viande crue et/ou maturée, la force maximale renseigne sur la résistance de la composante conjonctive (le pic de résistance correspondant au tissu conjonctif étant plus haut), alors que l'énergie à la rupture renseigne sur la résistance engendrée à la fois par le tissu conjonctif et par les myofibres (Lepetit et Culioli, 1992). Sur viande cuite, l'allure de la courbe de déformation, et donc la signification de la force maximale, dépend du barème de cuisson (Laroche, 1976).

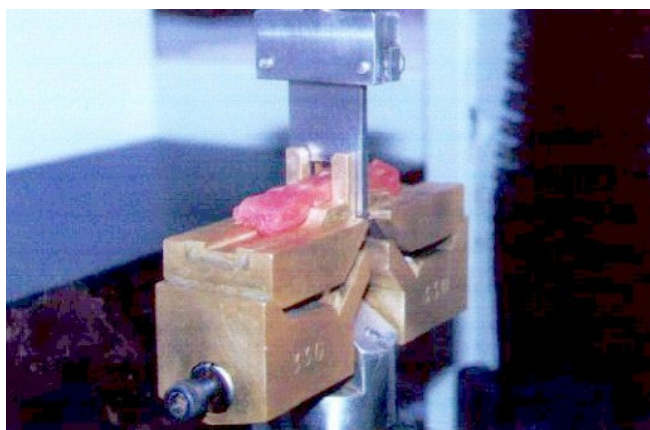


Figure B-4. Cellule de cisaillement installée sur une machine d'essais Instron 4501.

B.1.3 Caractérisation du tissu conjonctif

B.1.3.1 Résistance mécanique du tissu conjonctif

La résistance de la trame conjonctive musculaire a été déterminée en compression en utilisant la même méthode que celle mise en œuvre pour le contrôle de l'état de maturation de la viande (chap. B.1.2.1). La contrainte (C80, N/cm²) atteinte à 80% de déformation a été ainsi déterminée. Des études antérieures ont démontré que cette contrainte, fortement corrélée à la teneur en collagène des muscles, est caractéristique de la résistance mécanique du tissu conjonctif de la viande à l'état cru (Lepetit et Culioli, 1994).

B.1.3.2 Dosage de la teneur en collagène

La teneur en collagène a été déterminée selon la technique de Bergman et Loxley (Bergman et Loxley, 1963), adaptée par Bonnet et Kopp (Bonnet et Kopp, 1986) sur cinq prises de muscle broyé de 3 g chacune. Ce dosage par colorimétrie repose sur l'hydrolyse à chaud de l'échantillon de viande en milieu acide suivie par le dosage de l'hydroxyproline, acide aminé spécifique du collagène. La chloramine T a la propriété d'oxyder l'hydroxyproline en un dérivé pyrrole, qui, au contact du réactif d'Erlich (para-diméthyl-amino-4-benzaldéhyde), forme un composé coloré absorbant à 550 nm. Un auto-analyseur à flux continu Technicon (Bran & Luebbe), a été utilisé pour ces dosages en série. La teneur en collagène ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de muscle frais) a été calculée en multipliant la concentration en hydroxyproline par un coefficient 7,5.

B.1.3.3 Analyse histologique

L'analyse histologique a été réalisée sur des coupes préparées à partir d'échantillons de viande congelée. Des cubes de 2 cm de côté et de 1 cm d'épaisseur ont été coupés parallèlement aux fibres et collés sur un support de liège de manière à obtenir des coupes transversales aux myofibres, à l'aide d'un milieu d'enrobage O.C.T. compound, Tissue Tek (Sakura, Japon). Ils ont ensuite été immergés, pendant 30 s, dans de l'isopentane refroidi avec de l'azote liquide à -160°C (température de congélation de l'isopentane), (Bancroft et Stevens, 1990). Cette méthode de congélation, très rapide et sans dégagement gazeux, permet de ne pas altérer les structures. Elle autorise, en outre, la réalisation de coupes de section assez large (environ 4 cm^2), permettant l'observation du réseau conjonctif. Les échantillons congelés ont alors été conservés à -80°C jusqu'au moment de la coupe.

Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un microtome à congélation ou cryostat (Reichert-Jung référence 2800 E), maintenu à -20°C . Une coupe de $10\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur a été réalisée par échantillon de muscle, au nombre de deux par animal. Toutes les coupes ont été colorées au Rouge Sirius selon le protocole de Flint et Pickering (1984) modifié par Liu et al. (1994). Le rouge Sirius se fixe sur le complexe formé par l'acide picrique et le collagène. Ainsi, le collagène de couleur rouge se distingue aisément des fibres musculaires qui apparaissent en jaune (Figure B-5).

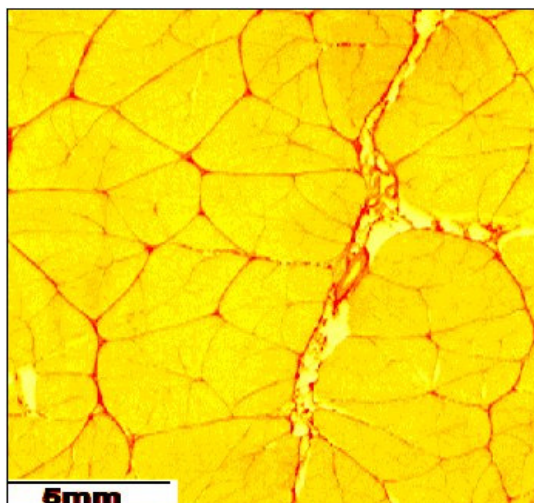


Figure B-5. Coupe du muscle Biceps femoris colorée au Rouge Sirius

B.1.3.4 Acquisition des images

Les images des coupes histologiques ont été numérisées en niveaux de gris en utilisant une table lumineuse en transmission et une caméra CCD (Coupled Charge Device) JAI CV-M300 (résolution 580×485) couplé à un objectif macroscopique Micro-Nikkor 60 mm f/2.8 D (Nikon, Japon) (grossissement deux fois) générant un pixel mesurant $27 \times 27 \mu\text{m}^2$ (Figure B-6). Toutes les acquisitions d'image ont été effectuées dans les mêmes conditions de lumière et de contraste, après réglage de ces deux paramètres pour une prise de vue optimale, et à la même hauteur de poterne pour conserver la même échelle.

La dynamique des histogrammes a été améliorée en éliminant les phénomènes de réflexion, grâce à des masques noirs. Un filtre vert a été fixé à l'objectif pour améliorer le contraste. Les images ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Visilog 5.4.

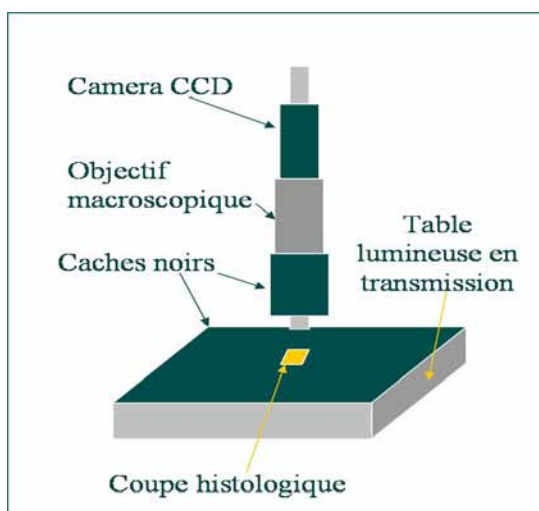


Figure B-6. Banc d'imagerie utilisé pour l'acquisition des images de coupes histologiques de muscle.

Les histogrammes d'intensité des images ont été calculés et les paramètres tels que la moyenne (m), l'écart type (σ), un facteur d'asymétrie par rapport à une distribution gaussienne (sk pour skewness) et l'aplatissement (k pour kurtosis) ont été calculés à partir des moments des images. Ces deux derniers paramètres caractérisent la forme du pic dominant.

Les formules de calcul du facteur d'asymétrie et du coefficient d'aplatissement sont :

$$Sk = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^3}{(n-1)\sigma^3} \quad \text{Eq B-1}$$

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^4}{(n-1)\sigma^4} \quad \text{Eq B-2}$$

avec σ , l'écart type ; \bar{X} , la moyenne ; X_i , le nombre de pixels de l'image pour le niveau de gris i et n le nombre de niveaux de gris de l'image.

B.1.4 Segmentation

Une étape de segmentation pour extraire, à partir des images numérisées, le tissu conjonctif a été nécessaire avant de pouvoir effectuer les traitements d'analyse du réseau périmysial. Les images obtenues présentaient un fort contraste entre le tissu conjonctif et les myofibres ; le seuillage est donc a priori une technique de segmentation adaptée. Cependant il faut pouvoir définir de manière adaptative le seuil optimal tenant compte des caractéristiques de l'image et mesurer les performances de la segmentation. Nos images présentent des histogrammes unimodaux à cause du pic des myofibres (fond) qui submerge celui du tissu conjonctif (objet) (Figure B-7). Comme l'a souligné Rosin (2001), la plupart des algorithmes de seuillage échouent dans le cas unimodal, puisqu'ils sont pour la plupart basés sur la recherche des zones de concavité comme seuils. De plus le contraste entre le tissu conjonctif et les myofibres est variable sur nos images pour deux raisons. D'abord, le contraste diminue intrinsèquement avec l'épaisseur du tissu conjonctif, la quantité de colorant fixé étant proportionnelle à la quantité de tissu conjonctif. Ensuite le contraste varie extrinsèquement à cause de l'hétérogénéité spatiale du fond liée à l'éclairage ou encore aux défauts du capteur de la caméra (Likar et Viergever, 2000).

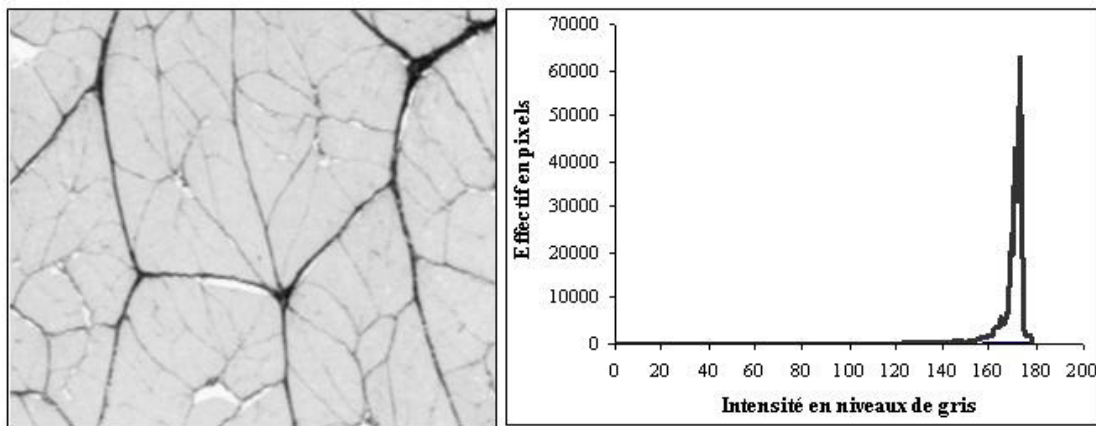


Figure B-7. Image en niveaux de gris d'une coupe histologique de muscle Biceps femoris de bovin colorée au rouge Sirius, mettant en évidence le tissu conjonctif et son histogramme unimodal.

Rosin (2001) a proposé une méthode de seuillage pour les images caractérisées par un histogramme unimodal ; basée sur la recherche de la courbure maximale de l'histogramme. Les performances de son algorithme ont été étudiées sur des distributions théoriques et sur des images synthétiques. Pour autant Baradez et al. (2004), dans une analyse comparée des techniques de seuillage adaptés à des histogrammes unimodaux, ont conclu qu'aucune d'entre elles, y compris celle de Rosin, ne permettait de segmenter efficacement ses images obtenues en microscopie confocale. Ces auteurs ont comparé trois autres méthodes de seuillage basées sur l'histogramme, proposées pour traiter de manière robuste des distributions unimodales. Baradez et al. (2004) a souligné la pertinence d'une méthode multi-échelle pour segmenter ses images à histogramme unimodal. Ce seuillage local est fondé sur la recherche du taux de diffusion de chaque niveau de gris. La diffusion correspond au flot d'intensité des pixels clairs vers les pixels sombres. De ce fait, le signal a un taux de diffusion plus élevé que le fond. Pour autant, cette méthode est relativement complexe à mettre en œuvre et le choix a été fait de plutôt s'orienter vers un seuillage global.

Compte tenu de ces résultats, il apparaît que toute méthode de segmentation ne peut être utilisée qu'après une phase de validation permettant d'évaluer la précision de l'algorithme et ses domaines de validité. Dans la littérature, plusieurs méthodes de validation ont été utilisées. Généralement, les auteurs appliquent leurs algorithmes sur leurs propres images, puis sur des données synthétiques comme des distributions statistiques (Rosin, 2001) ou des banques d'images (Rosin, 2001 ; Baradez et al., 2004). Baradez et al. (2004) ont comparé trois méthodes potentielles par rapport à des approches classiques, visuellement, et en comparant différentes valeurs obtenues comme le seuil déterminé par chaque algorithme, la moyenne du

signal segmenté ou encore la surface segmentée. Certains ont aussi utilisé des paramètres statistiques, comme la mesure d'uniformité U (Tsai, 1995).

$$U = 1 - \sigma W^2 / \sigma T^2 \quad 0 \leq U \leq 1 \quad \text{Eq B-3}$$

avec σW^2 , variance intraclasse pour un seuil donné et σT^2 , la variance totale de l'image.

Une image correctement segmentée présente une valeur d'uniformité proche de 1.

La méthode de segmentation que nous avons mise au point au cours de la présente étude est fondée sur un seuillage à partir de cartes probabilistes (PMT pour Probabilistic Maps Thresholding). Elle est basée sur la construction de cartes de référence et repose sur une phase d'apprentissage, qui permet de prédéterminer la précision de la segmentation.

B.1.4.1 Construction des cartes de référence

Les cartes probabilistes de référence du tissu conjonctif périmysial ont été tout d'abord construites à partir des coupes histologiques pour mettre au point des règles de seuillage, combinaisons linéaires des paramètres de l'histogramme d'intensité des images.

Dix images correspondant à des sections de $7 \times 7 \text{ mm}^2$ (Figure B-8a) d'images prises en condition standard constituaient la base d'apprentissage. Elles ont été présentées au hasard, à un panel de vingt juges non entraînés qui devaient effectuer la segmentation manuelle des points appartenant au périmysium. Le jury était constitué d'autant d'hommes que de femmes. Le mode et l'ordre de présentation ont été conçus selon un carré latin, de façon à ce que chaque image soit présentée le même nombre de fois en première position, deuxième position, etc... Les juges devaient dessiner (avec un trait d'un pixel d'épaisseur), le tissu conjonctif (Figure B-8b). Pour les aider, les segments les plus épais non équivoques avaient déjà été surlignés en seuillant grossièrement l'image à un niveau de gris faible (100). Ainsi les juges n'avaient plus qu'à dessiner les éléments les plus fins du réseau, dont l'étiquetage était le plus délicat. Les dessins ont ensuite été moyennés pour chaque image afin d'obtenir in fine les cartes probabilistes du réseau conjonctif en niveaux de gris (Figure B-8c),

$$\text{i.e. } \mu_{\text{ref}} = \sum_i S_i / N, \quad \text{Eq B-4}$$

avec S_i le signal de la carte binaire dessinée par le i ème juge, et N le nombre de juges.

Par construction une carte probabiliste est en niveau de gris (Figure B-8c). En effet, les niveaux de gris sont proportionnels à la probabilité d'appartenance à la classe dessinée (réseau périmysial) μ^{ref} . Elle doit donc être binarisée pour pouvoir être comparée avec le résultat de notre méthode adaptative de seuillage. Quand la carte de référence est seuillée, l'image

binaire ($\mu_\varepsilon^{\text{ref}}$) contient les pixels sélectionnés par un certain pourcentage de juges ; ε fait donc naturellement référence à un niveau de confiance.

Soit $\mu_\varepsilon^{\text{ref}}$ l'image binaire résultant du seuillage de la carte probabiliste μ_{ref} au niveau de confiance ε , notée ainsi:

$$\begin{cases} \mu_\varepsilon^{\text{ref}} = 1 \text{ si } \mu^{\text{ref}} \geq \varepsilon \\ \mu_\varepsilon^{\text{ref}} = 0 \text{ sinon} \end{cases} \quad \text{Eq B-5}$$

Un ε élevé ($\varepsilon > 50\%$) correspond à un consensus des juges, qui révèle les points sélectionnés par une majorité de juges. Dans ce cas, $\mu_\varepsilon^{\text{ref}}$ représente naturellement les segments épais, sélectionnés sans ambiguïté (Figure B-8d). De manière implicite, pour $\varepsilon < 50\%$, la carte de référence seuillée comporte en plus les segments fins (Figure B-8e).

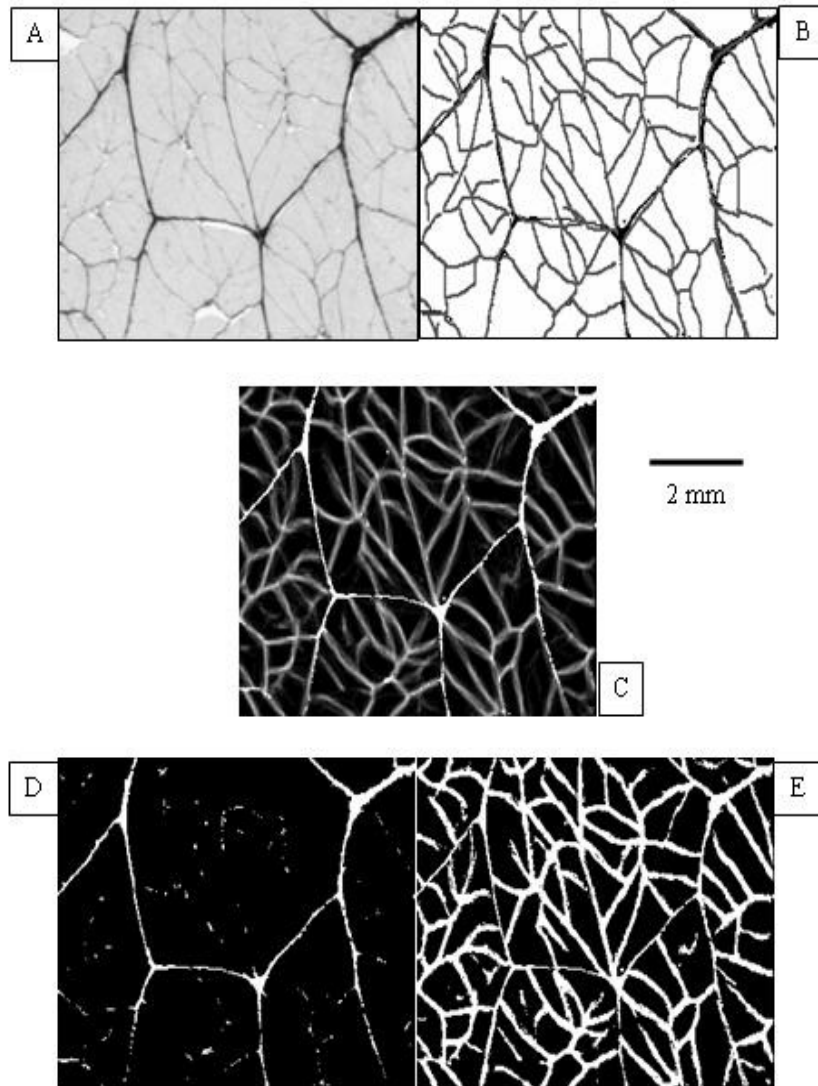


Figure B-8. Les différentes étapes de la construction d'une carte de référence probabiliste, de l'image originale (a) à la carte de moyenne pour $N = 20$ juges (c). En (b) on observe le tracé d'un juge. En (d) et (e) les seuillages de la carte de référence à différents niveaux de confiance $\varepsilon = 80\%$ et 40% , respectivement.

B.1.4.2 Calcul d'un index de performance

Pour quantifier les résultats de segmentation, un index de performance, exprimant la similarité entre la carte de référence et l'image seuillée, a été calculé.

Appelons $\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}}$ l'ensemble de points appartenant au périnysium désignant la vérité-terrain (objet), et $(\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}})^C$ le complémentaire correspondant aux points indésirables appartenant pour la plupart aux myofibres (fond). Avec μ l'ensemble segmenté obtenu après seuillage global, la valeur de seuil optimal t^* est obtenue en minimisant l'erreur totale E , qui est la fraction des pixels segmentés de manière impropre. Elle est la moyenne :

- de **l'erreur sur les objets (Eoo)** correspondant à la fraction des pixels de l'image appartenant aux objets faussement attribués au fond

$$E_{oo} = |\mu^C \cap \mu_{\varepsilon}^{\text{ref}}| / |\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}}| \quad \text{Eq B-6}$$

- et de **l'erreur sur le fond (Eob)** correspondant à la fraction des pixels de l'image appartenant au fond et faussement attribués aux objets

$$E_{ob} = |\mu \cap (\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}})^C| / |(\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}})^C| \quad \text{Eq B-7.}$$

Le même poids est attribué empiriquement aux deux termes de l'erreur à minimiser. Cependant les taux d'erreur E_{oo} et E_{ob} devaient tenir compte de la disproportion des effectifs de l'objet et du fond. Ainsi E_{oo} est ramené au faible nombre de pixels constituant le réseau $(\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}})$ et E_{ob} au grand nombre de pixels du fond $((\mu_{\varepsilon}^{\text{ref}})^C)$. Le seuil optimal t^* est déterminé pour un niveau de confiance donné ε . La Figure B-9 montre que E_{ob} décroît et E_{oo} croît continuellement en fonction du seuil. En outre E présente un minimum local, qui correspond à la valeur optimale de t (t^*), minimisant l'erreur de classification selon le critère E .

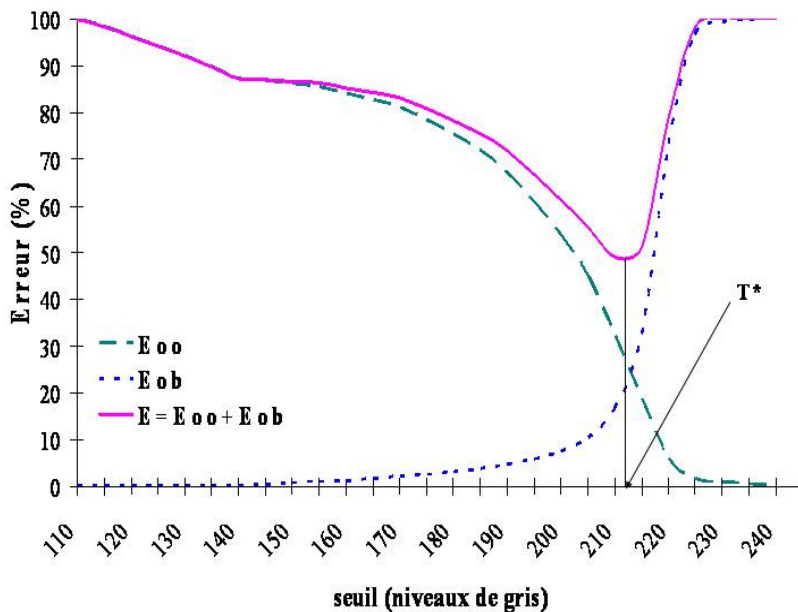


Figure B-9. Evolution des pourcentages d'erreur totale (E), d'erreur sur les objets (E_{oo}) et d'erreur sur le fond (E_{ob}), en fonction du niveau de gris de seuillage de l'image traitée. Le minimum global de E correspond à t^* , seuillage optimal de l'image par rapport à la carte de référence correspondante.

B.1.4.3 Règles de seuillage

Pour chaque image, t^* le seuil optimal pour le critère E a pu être déterminé aux différents niveaux de confiance. Notre approche était basée sur la définition d'une régression multilinéaire entre le seuil t^* et les paramètres de l'histogramme (moyenne, écart-type, coefficient d'asymétrie et d'aplatissement) calculés à partir des moments de la distribution. Ces modèles ont fourni des règles de seuillage utilisées pour calculer le niveau de gris de seuillage optimal pour chaque image acquise dans les mêmes conditions standardisées. A cause de la dépendance de t^* par rapport au niveau de confiance, les règles de seuillage ont dû être calculées en fonction du niveau de confiance en répétant l'analyse statistique pour chaque niveau de confiance désiré.

Grâce au logiciel SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 1995), une régression linéaire multiple pas à pas (procédure GLM) a été réalisée entre les valeurs de t^* et les paramètres d'histogramme pour chaque image-test ($I_t = 10$) aux différents niveaux de confiance (de 30% à 80% par pas de 5%).

Une régression est caractérisée par son coefficient de détermination R^2 ($0 \leq R^2 \leq 1$) qui représente la liaison entre les variables à expliquer et les variables explicatives. Si $R^2 = 1$, les variables à expliquer et les variables explicatives sont confondues. Si $R^2 = 0$, elles ne sont pas liées. Dans le cas d'une régression multiple (modèles avec plusieurs variables explicatives), le coefficient de détermination est ajusté en fonction du nombre de variables entrées dans le modèle. Nous avons choisi la méthode de régression progressive, pour laquelle la première variable entrante est la plus corrélée avec la variable à expliquer, et les suivantes entrent de manière à maximiser le coefficient de détermination ajusté. Les seuils de signification pour entrer et sortir du modèle ont été établis à 5%.

B.1.4.4 Techniques de validation

La validation de cette méthode a été réalisée en trois étapes :

- la quantification des erreurs absolues par rapport aux cartes de référence probabilistes
- la comparaison avec une méthode de seuillage basée sur l'histogramme adaptée aux images comportant des histogrammes unimodaux (RT pour Rosin thresholding)
- la comparaison du volume de l'image segmentée avec la teneur en collagène déterminée chimiquement sur la même coupe de tissu musculaire.

La validation a été effectuée en comparant la segmentation PMT à une autre méthode de seuillage (RT), qui a été choisie pour sa capacité à segmenter des images unimodales (Rosin, 2001). En effet d'autres méthodes courantes de seuillage ont été testées mais elles ne parvenaient pas à extraire efficacement le tissu conjonctif. Parmi celles-ci, la méthode d'Otsu, très utilisée, maximisant la variance inter-classe (Otsu, 1979) a donné de piètres résultats à cause de la disproportion des modes fibres et tissu conjonctif.

Un autre moyen de valider l'algorithme PMT a consisté à comparer le volume des pixels segmentés avec la teneur en collagène mesurée sur les coupes de muscle utilisées pour acquérir les images. Ceci a été réalisé en quantifiant le rouge Sirius, fixé sur le collagène, selon la méthode de Lopez de Leon et Rojkind (1985). Trois coupes sériées transversales de muscle (10 µm d'épaisseur) ont été réalisées et colorées au rouge Sirius. Comme les variations de teneur en collagène entre deux coupes successives étaient faibles, une série de coupes colorées a été numérisée pour mesurer la surface de périnysium segmenté et les deux autres ont servi à déterminer la teneur en collagène à partir de la quantité de colorant. Ces coupes ont été éluées avec une solution de méthanol absolu et de soude 0,1 N (1: 1; v: v). La concentration de colorant a été calculée à partir des mesures d'absorbance de l'éluat à 535 et 605 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi U-2001 (Lopez De Leon et Rojkind, 1985) selon l'équation suivante :

$$\text{Quantité de protéines collagéniques / protéines totales} = \frac{\frac{DO_{605}}{20,8}}{\frac{DO_{605}}{20,8} + \frac{DO_{535} - 0,291 \times DO_{605}}{38,4}} \quad \text{Eq B-8}$$

B.1.4.5 Extraction de primitives après la segmentation

La segmentation a permis d'extraire le réseau de périnysium afin de le mesurer. La première primitive mesurée a été la surface occupée par les pixels appartenant au réseau. La comparaison avec la quantité de collagène mesurée sur coupes a servi de validation pour cette mesure. La surface du réseau a été mesurée à tous les niveaux de confiance de 30 à 80% avec un pas de 10%, afin de déterminer les niveaux de confiance ϵ nécessaires pour caractériser les structures mises en évidence aux différentes échelles utilisées.

La longueur du réseau a également été mesurée afin de caractériser le niveau de ramification du périnysium. En effet, plus le réseau est long, plus le périnysium est ramifié. Pour calculer la longueur, le réseau segmenté a été squelettisé. C'est la surface du squelette qui permet d'évaluer la longueur du périnysium.

A partir du rapport entre la surface et la longueur, l'épaisseur moyenne du réseau peut être estimée. Afin de valider cet estimateur, la valeur de ce rapport a été comparée à la mesure manuelle du périmysium secondaire sur les 24 échantillons de l'étude préliminaire (chap. B.1.1). Sur chaque image d'un échantillon, l'épaisseur de vingt segments a été mesurée en trois points pour chaque segment. L'épaisseur moyenne attribuée à chaque échantillon est donc la moyenne de soixante mesures.

B.1.5 Analyse statistique

L'influence des facteurs « animal » et « muscle » sur les mesures mécaniques et le dosage du collagène a été déterminée par analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel SAS. Le seuil de probabilité d'erreur en rejetant l'hypothèse nulle a été fixé à 5%. L'analyse de variance a été suivie d'une comparaison multiple de moyenne selon le test post hoc de Neuman-Keuls. Ce test a permis de rechercher quelles moyennes étaient différentes et lesquelles ne l'étaient pas. Il a permis de constituer des groupes (notés a, b, c ...) homogènes pour un facteur considéré. Les moyennes pour un même groupe ne présentaient alors pas de différence significative au seuil de 5%.

B.2 ORGANISATION SPATIALE DU PERIMYSIUM ET TEXTURE DE LA VIANDE CUITE

Le but de cette seconde partie était de mettre en évidence la relation entre l'organisation spatiale du tissu conjonctif et la tendreté de la viande en utilisant un modèle dont l'unique facteur de variation était le type de muscle. La plupart des méthodes employées ont été identiques à celles présentées dans l'étude préliminaire, et ne seront donc pas décrites à nouveau. Le travail expérimental de cette seconde partie s'est articulé en trois étapes. Lors de la première étape la texture de la viande a été évaluée à l'aide d'une méthode instrumentale (test de compression) et par un jury de dégustation, après avoir vérifié que les échantillons ne présentaient pas d'anomalies (maturation insuffisante ou contraction au froid). Lors de la seconde étape le tissu conjonctif a été caractérisé ; sa quantité, ses propriétés thermiques, son organisation dans le muscle et sa composition ont été ainsi déterminées. Enfin, la troisième étape a consisté à mettre en relation les données obtenues au cours des étapes précédentes, à l'aide de la modélisation statistique.

B.2.1 Echantillons de muscle

Quatre muscles, *Biceps femoris* (BF), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT) et *Pectoralis profundus* (PP), ont été retenus après l'étude préliminaire, dont les résultats sont présentés chapitre C.4.1.

Huit vaches charolaises âgées de 35 à 82 mois ont été abattues dans un abattoir commercial (SICABA, Bourbon l'Archambault, France). Les muscles entiers BF, IS et PP, ainsi que la partie comprise entre la 7^{ième} et la 11^{ième} côte du LT ont été prélevés sur les deux demi carcasses à 48 h *post mortem* (J2).

Les muscles ont immédiatement été tranchés en steaks d'environ 4 cm d'épaisseur, emballés sous vide et conservés à 4°C pendant 21 jours *post mortem* (J21) avant d'être analysés. Cette maturation prolongée a permis de limiter les variations de tendreté liées à la contribution des myofibres à la résistance mécanique de la viande et en conséquence de mieux mettre en évidence les différences liées au tissu conjonctif. Pour garantir la qualité des images, les blocs destinés à l'histologie ont été prélevés au temps *post mortem* J2. Les prélèvements pour les différentes analyses ont été effectués au temps J21, selon un même plan illustré sur la Figure B-10.

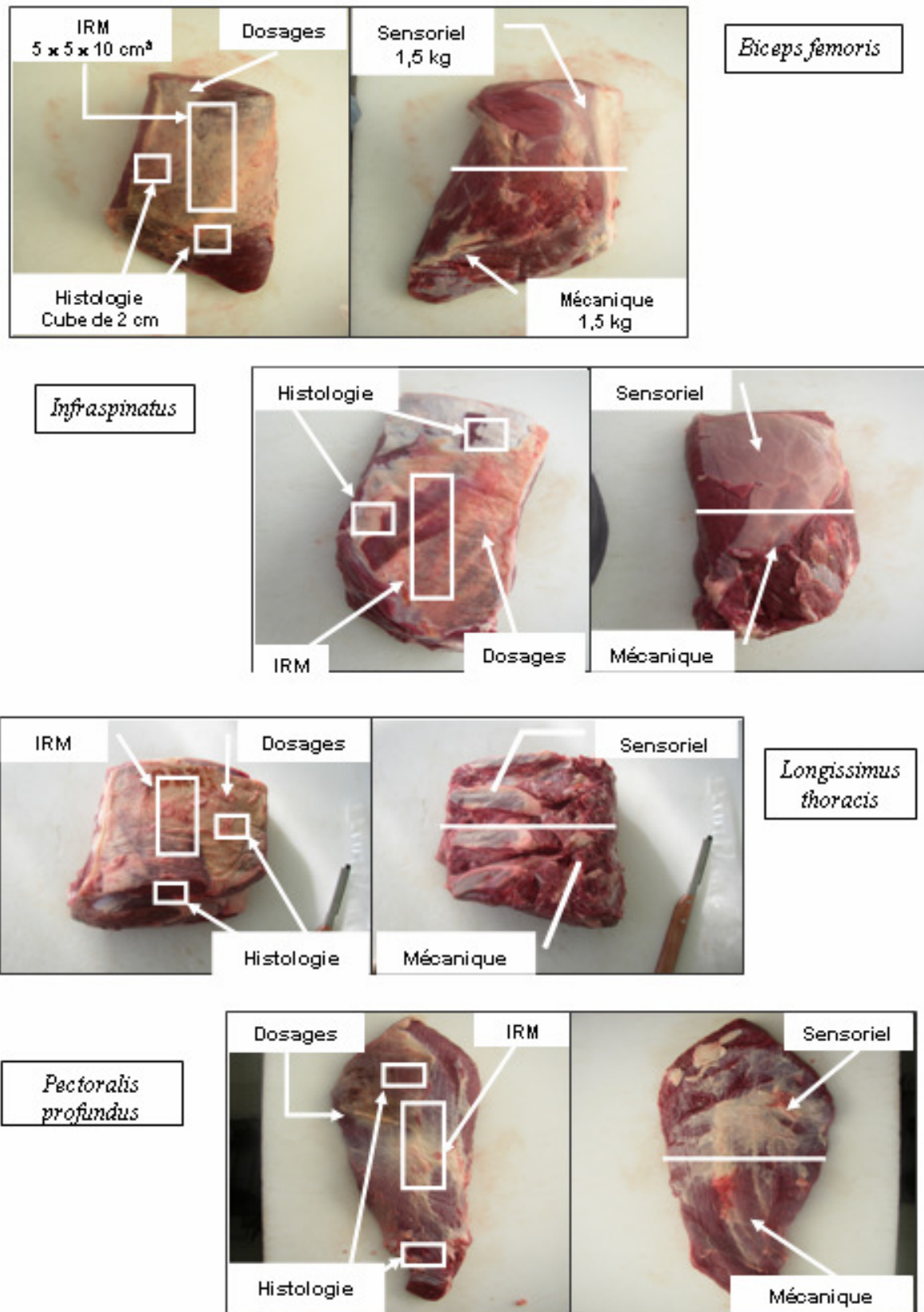


Figure B-10. Plan de prélèvement des échantillons selon les types de muscle. A 48 h *post mortem*, deux cubes de 2 cm d'arête ont été prélevés pour l'histologie. A 21 jours *post mortem*, un échantillon a été prélevé pour l'imagerie par résonance magnétique, le reste du muscle étant partagé entre les dosages et les mesures de texture.

B.2.2 Evaluation de la texture

B.2.2.1 Mesures instrumentales

Après avoir vérifié l'état de contraction en mesurant la longueur de sarcomères et l'état de maturation par la mesure de la contrainte en compression à 20% de déformation sur viande crue (chap. B.1.2.1), la résistance mécanique de la viande crue et de la viande cuite à 65°C pendant 30 minutes (chap. B.1.3.1) a été déterminée par la mesure de la contrainte en compression à un taux de déformation de 80%.

B.2.2.2 Profil de texture sensoriel

Une première séance d'entraînement a servi à générer le vocabulaire à partir de deux muscles opposés : le *Longissimus thoracis* et le *Pectoralis profundus*, soumis aux mêmes conditions de maturation (21 jours) et de cuisson (30 minutes à 65°C). Les deux séances d'entraînement suivantes ont été réalisées sur des échantillons des quatre muscles étudiés, pour valider les attributs choisis et se familiariser avec leur signification.

Huit séances avec un panel de neuf juges ont été nécessaires pour évaluer la texture des échantillons. Chaque échantillon, identifié par un code, a été présenté deux fois, selon un carré latin, c'est-à-dire que chaque échantillon est présenté le même nombre de fois au même rang. Une séance a permis de présenter les échantillons issus d'un seul animal, de manière à avoir accès à l'effet « animal », même s'il est confondu avec l'effet « séance ».

Les échantillons, cuits selon les mêmes conditions que ceux testés mécaniquement (65°C pendant 30 minutes), ont été présentés à température ambiante sous forme de trois cubes de 1,5 cm d'arête, après avoir été décongelés à 4°C pendant une nuit.

Un profil sensoriel des quatre types de muscles a été établi grâce à un jury de dix juges expérimentés, comprenant trois hommes et sept femmes. Les échantillons, cuits selon les mêmes conditions que ceux testés mécaniquement (65°C pendant 30 minutes), ont été présentés à température ambiante sous forme de trois cubes de 1,5 cm d'arête, après avoir été décongelés à 4°C pendant une nuit. La définition du profil sur les échantillons de l'étude a été précédée par trois séances d'entraînement. Le vocabulaire descriptif des propriétés de texture de la viande a été généré lors d'une première séance d'entraînement au cours de laquelle deux muscles de tendreté extrême (*Longissimus thoracis* et *Pectoralis profundus*) traités dans les mêmes conditions de maturation (21 jours) et de cuisson (30 minutes à 65°C) ont été proposés aux juges. Les deux séances d'entraînement suivantes ont eu pour objectif de valider, pour

l'ensemble des quatre muscles étudiés, les attributs choisis et pour que les juges se familiarisent avec leur signification.

B.2.3 Caractérisation du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif intramusculaire de l'ensemble des muscles a été caractérisé par :

- la teneur en ses principaux composants (collagène et lipides)
- l'organisation spatiale à plusieurs échelles
- la répartition de ses différents composants.

B.2.3.1 Quantification

Quantité et stabilité thermique du collagène

Dans un premier temps, les quantités de collagène total et soluble ont été déterminées, selon la technique décrite précédemment (chap. B.1.3.2). La stabilité thermique du collagène a été ensuite évaluée en mesurant la fraction de collagène solubilisée après un traitement thermique à 65°C pendant 30 minutes (traitement identique à celui appliqué aux échantillons utilisés pour les tests de compression et le profil sensoriel). La concentration de collagène insoluble a été déterminée en appliquant la même procédure de dosage du collagène sur le résidu obtenu après chauffage de l'échantillon de viande broyé dans une solution tampon de Tris-HCl 0,02M, NaCl 0,23M, pH 7,4 (1:5 m/v) comme décrit par Bonnet et Kopp (1986). La solubilité thermique du collagène a été calculée comme le pourcentage de collagène soluble ($100 - \% \text{ de collagène insoluble}$) par rapport au collagène total.

Teneurs en lipides

Les teneurs en lipides ont été déterminées par spectrométrie infra rouge à l'aide d'un spectrophotomètre Foodscan (FOSS Electric, Hillerød, Danemark). Quatre vingt grammes de broyat de chaque muscle ont été déposés dans une boîte de Pétri, de manière à obtenir une épaisseur constante de 1 cm. La température des échantillons durant la mesure a été contrôlée et maintenue à $16^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La quantité de lipides totaux a été calculée à partir de l'analyse des spectres obtenus en transmission dans le proche infrarouge (entre 850 et 1050 nm, avec un pas de 2 nm) en seize points de l'échantillon.

B.2.3.2 Organisation spatiale du tissu conjonctif

Etude histologique

Des coupes transversales de muscles ont été réalisées selon la même méthode que celle décrite chapitre B.1.3.3 à partir d'échantillons prélevés, 48h *post mortem*, sur les muscles des huit animaux. Ces coupes histologiques ont été colorées au rouge Sirius selon la méthode décrite chapitre B.1.3.3 et des images (512×512) ont été acquises sur le banc d'imagerie présenté chapitre B.1.3.4, avec une résolution de 0,027 mm / px.

Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)

Des images des échantillons de $50 \times 50 \times 100 \text{ mm}^3$ de volume, ont été acquises, en IRM à haut champ à l'aide d'un spectromètre Biospec 47/40 utilisant un aimant supraconducteur 4,7 T (200 MHz) avec une ouverture horizontale de 40 cm. Les échantillons ont été placés sous vide de manière à éviter les pertes d'eau durant le temps d'imagerie. Leur forme était maintenue grâce à un cadre en plastique.

Une première séquence CSS-IR (Chemical Shift Selective - Inversion Recovery) en mode Water saturated (WS), décrite par Laurent (Laurent, 2000), a permis la détection spécifique du tissu adipeux (Figure B-11). Vingt-cinq coupes de $256 \times 256 \text{ px}^2$ ont été acquises avec un voxel mesurant environ $20 \times 20 \times 200 \text{ }\mu\text{m}^3$. Pour visualiser la répartition des lipides en trois dimensions, une reconstruction isotrope a été réalisée en rediscrétisant les vingt-cinq coupes en 256 par interpolation.

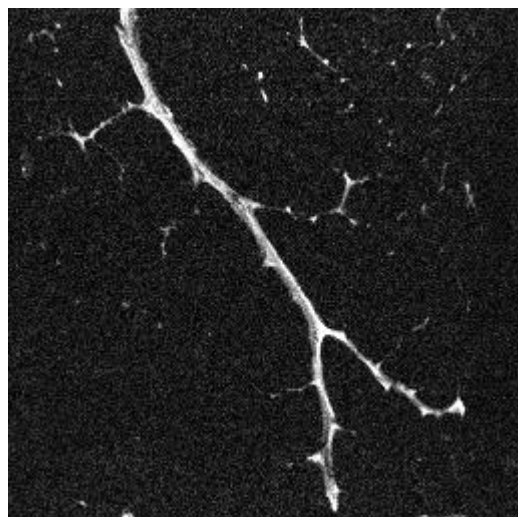


Figure B-11. Image par résonance magnétique nucléaire de muscle *Biceps femoris* selon une séquence d'imagerie CSS-IR en mode « water saturated » à 4.7 T. En blanc, apparaît le tissu adipeux et en noir les myofibres.

Une seconde séquence pondérée en susceptibilité selon le protocole décrit par Bonny *et al.* (Bonny *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence le tissu conjonctif complet (Figure

B-12). Les paramètres des séquences ont été optimisés pour obtenir une taille de voxel de $0,1 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}^3$ pour une durée d'acquisition de 5h 41min. Dix blocs de deux coupes de $512 \times 512 \text{ px}^2$ ont été acquis. Les centres des blocs sont espacés de $50 \mu\text{m}$ et les coupes au sein d'un bloc sont espacées de $5 \mu\text{m}$.

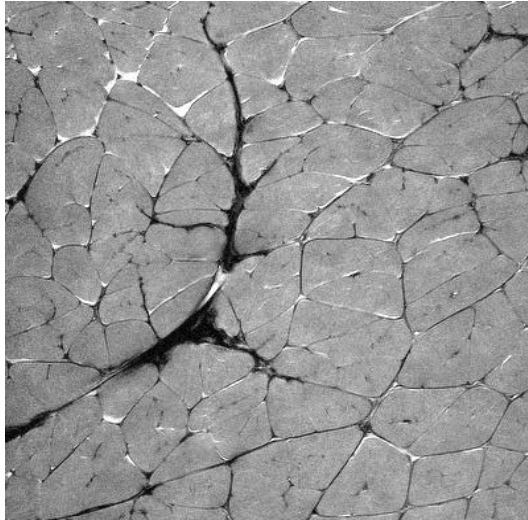


Figure B-12. Image par résonance magnétique nucléaire de muscle *Biceps femoris* selon une séquence d'imagerie pondérée en susceptibilité magnétique à 4.7 T. En noir, apparaît le tissu conjonctif contenant le tissu adipeux, en gris les myofibrilles et en blanc l'eau libre.

Traitement d'images

L'analyse des images obtenues par IRM a nécessité la mise au point de règles de seuillage adaptées à cette modalité d'imagerie. Un second jeu de cartes de références a dû être construit. Pour améliorer le rapport signal sur bruit des images rendues plus homogènes par le choix d'une épaisseur de coupe fine, les images ont été moyennées deux à deux de proche en proche. Seules les images correspondant à des coupes centrales de l'échantillon ont été utilisées, pour éviter les zones sombres apparaissant sur les bords et dues aux variations du champ magnétique local (chap. D.3.3). Ainsi vingt coupes acquises ont donné dix coupes moyennes, parmi lesquels seules les six centrales ont été utilisées pour l'étude.

Les images RMN, comme celles en histologie nécessitent un prétraitement en vue d'homogénéiser leur fond. La méthode couramment utilisée consiste à réaliser une fermeture morphologique (dilatation suivie d'une érosion) à l'aide d'un élément structurant de grande taille. Ce dernier doit être suffisamment grand pour ne pas s'inscrire dans l'épaisseur du réseau. Les images ont été seuillées par leur PMT respectif à 80%, et la taille du plus grand élément inscrit (R_{max}) a été déterminée par granulométrie. De cette manière, les irrégularités du fond ont été extraites à l'aide d'une fermeture $R_{\text{max}}+1$. L'image originale a donc été divisée par l'image après fermeture, pour obtenir l'image corrigée.

Le seuillage PMT(histo) a été appliqué sur les images de coupes musculaires colorées au Rouge Sirius provenant des 32 échantillons sur lesquels deux blocs avaient été prélevés, soit

un total de 64 images en histologie. Pour chacune des modalités d'imagerie, deux niveaux de confiance 40 et 80% ont été choisis pour segmenter les images (chap. **D.3.2**). En histologie cela a permis d'extraire respectivement le réseau complet et uniquement le réseau épais. En IRM, la différence entre les deux niveaux de confiance était moins visible. En effet, la sensibilité de la méthode permet de visualiser uniquement le niveau de périnysium le plus grossier. La segmentation pour $\varepsilon = 40\%$ complète certains segments sans toutefois faire apparaître des faisceaux d'ordre inférieur.

Après segmentation des images obtenues selon les deux modalités, un certain nombre de mesures, regroupées en deux classes, ont été effectuées. Tout d'abord le réseau a été caractérisé par la surface occupée dans l'image (exprimée en pourcentage de surface totale), sa longueur et son épaisseur. La longueur a été évaluée par la surface du squelette du réseau (correspondant à une trame d'un pixel d'épaisseur) divisée par la surface totale de l'image. Cette normalisation a été effectuée pour tenir compte d'images de tailles différentes à cause de l'anatomie de certains des muscles étudiés (notamment le PP). L'épaisseur moyenne du réseau a été estimée par le rapport surface segmentée / longueur segmentée. Dans un second temps, le spectre granulométrique des images a été réalisé, afin d'appréhender la distribution des tailles des faisceaux délimités par le périnysium (Dougherty et Pelz, 1981). La segmentation du périnysium ne permettant pas d'obtenir un réseau fermé, le calcul direct de la surface des faisceaux de fibres musculaires n'était pas possible. En revanche, même non fermé, le périnysium pouvait agir comme un tamis pour des objets (éléments structurants) de tailles connues. Le dénombrement des objets traversant les mailles du réseau pour différents rayons a permis l'estimation indirecte de la taille des faisceaux délimités par le périnysium. Les images binaires du réseau segmenté ont été d'abord inversées. Puis les images rediscrétisées en grille hexagonale ont subi des ouvertures (érosion suivie d'une dilatation) successives avec un élément structurant hexagonal (objet qui se rapproche le plus du cercle) de taille croissante par pas de un pixel (Figure B-13). Les variables granulométriques correspondant à un élément structurant de rayon i pixels ont été nommées G_i pour les images RMN et H_i pour les images des coupes histologiques. Elles représentent la surface occupée par les hexagones d'un rayon de i pixels inscrits dans le réseau segmenté.

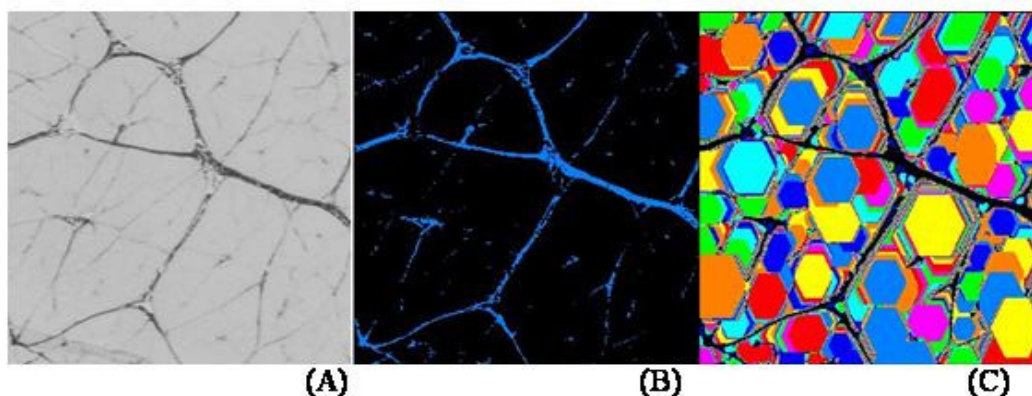


Figure B-13. Exemple d'analyse granulométrique sur une image de coupe histologique du muscle *Biceps femoris* (BF). A) image histologique originale, b) image histologique segmentée à 80% par la méthode PMT, c) répartition des éléments structurants hexagonaux.

B.2.3.3 Cartographie de la trame conjonctive

Outre la quantité et l'organisation spatiale du tissu conjonctif intramusculaire, la composition de celui-ci à ses différents niveaux de structuration peut influencer la tendreté de la viande. C'est la raison pour laquelle une cartographie de la trame conjonctive, localisant les différents types de collagène, ainsi que l'élastine et la décorine a été réalisée en fonction du type de muscles, du niveau hiérarchique, de l'épaisseur du tissu conjonctif, et de la présence d'adipocytes. De plus, cette cartographie a été utilisée dans la comparaison des images obtenues en histologie et en IRM, afin d'appréhender le rôle spécifique de chaque composé de la trame sur le signal pondéré en susceptibilité, principe sur lequel est fondé l'imagerie RMN du tissu conjonctif.

Coloration des lipides

La technique utilisée pour mettre en évidence les lipides est celle utilisant l'huile rouge O (Bancroft et Stevens, 1990). Les lipides apparaissent en rouge sur fond jaune (Figure B-14). Cette coloration nécessite un montage en milieu aqueux à la gélatine (Sigma diagnostics, USA), puisque les lipides sont solubles en phase organique.

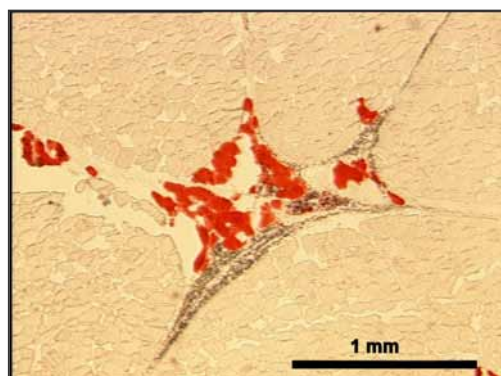


Figure B-14. Coupe musculaire colorée au Huile rouge O. Les adipocytes apparaissent en rouge.

Marquages fluorescents

Les Tableau B-1 et Tableau B-2 récapitulent les dilutions et espèces des anticorps utilisés. Afin d'éliminer la fluorescence naturelle du collagène, les coupes ont subi un prétraitement consistant à un premier passage de 5 minutes dans du NH_4Cl (50mM). Les sites aspécifiques ont ensuite été saturés avec une incubation de dix minutes avec de l'albumine sérique bovine (BSA) diluée à 1% dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline). Les coupes ont ensuite été incubées avec le premier anticorps pendant une heure. Puis elles ont été lavées par trois passages de 5 minutes dans du PBS. L'incubation avec le second anticorps a également duré une heure, précédant trois lavages au PBS de 5 minutes chacun. Enfin, les coupes ont été incubées 5 minutes dans du noir ériochrome à 0,3% dans du PBS afin d'éteindre un peu plus la fluorescence naturelle du collagène. Après avoir été lavées pour éliminer l'excès de colorant noir, les coupes ont été montées avec du Mowiol, milieu de montage préconisé pour sa capacité à ne pas bloquer la fluorescence.

Tableau B-1. Récapitulatif des caractéristiques des anticorps primaires utilisés.

Cible	Espèce	Référence	Dilution
Collagène I	Lapin anti bovin	Novotec, 20-121, France	1/20
Collagène III	Lapin anti bovin	Chemicon XAB750, USA	1/20
Collagène IV	Souris anti humain	Dako M785, Danemark	1/20
Collagène VI	Chèvre anti bovin	Chemicon AB 782, USA	1/40
Collagène XII	Souris anti bovin	Institut Pasteur, France	1/40
Collagène XIV	Souris anti bovin	Institut Pasteur, France	1/40
Elastine	Souris anti bovin	Sigma, USA	1/100
		Developmental studies	
Décorine	Souris anti bovin	hybridoma bank, Université de l'Iowa,	1/40

Tableau B-2. Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés.

Cible	Espèce	Marqueur	Référence	Dilution
Lapin	Chèvre	FITC	Molecular probes, USA	1/40
Chèvre	Souris	DTAF	Jackson 205-015-108, United Kingdom	1/80
Souris	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular probes, USA	1/40

Marquages révélés par la réaction de la peroxydase

Dans le but de mettre en évidence quelles molécules génèrent le signal acquis en IRM, d'autres marquages immunologiques ont été réalisés. En effet, pour effectuer des observations macroscopiques des marquages, le marquage fluorescent n'était pas adapté. Contrairement aux marquages précédents, l'anticorps secondaire n'a pas été marqué avec une molécule fluorescente mais avec un complexe peroxydase qui réagit en présence d'un substrat pour former un composé coloré.

Ces marquages ont été effectués sur des coupes issues des blocs échantillonnés pour l'IRM. Pour visualiser le collagène de type I et l'élastine, principaux composés du tissu conjonctif, des anticorps spécifiques ont été utilisés. Les anticorps primaires ont été produits chez la souris puis dilué au 1/500^{ième} pour le collagène I et au 1/100^{ième} pour l'élastine. Le second anticorps anti-souris, produit chez la chèvre, a été utilisé après dilution au 1/50^{ième}.

Afin d'éliminer l'activité peroxydase propre du tissu musculaire, les coupes ont été incubées en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), à 3% dans de l'eau distillée, pendant 5 minutes, avant d'être rincées à l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 10 minutes avec du sérum de chèvre (dilué à 10%) pour bloquer les sites de liaison non spécifiques, puis pendant une heure avec l'anticorps primaire dilué au 1/40^{ième} avec du PBS contenant 10% de sérum de chèvre. Les coupes ont été lavées deux fois pendant 10 minutes avec du tampon PBS Tween 20 (0,05%) ; le troisième lavage s'est effectué avec du PBS pendant 10 minutes. Les coupes ont été finalement incubées pendant une heure avec le second anticorps, marqué avec la peroxydase et dilué dans du PBS. Enfin deux lavages ont été effectués avec du PBS Tween pendant 10 minutes suivis d'un troisième avec de l'eau distillée. L'immuno-marquage a été révélé grâce au substrat coloré Novared (Vector, USA), dont l'excédent a été éliminé

dans de l'eau distillée avant le montage des lames à l'aide du milieu aqueux Gelmount (Microm, France).

B.2.4 Analyse statistique et modélisation

B.2.4.1 Analyse de variance

Effet muscle sur les variables

Une analyse de variance à une voie et un test de comparaison multiple de moyenne de Neuman-Keuls ($p < 0,05$) ont été réalisés à l'aide du logiciel XLstat (Adinsoft, version 7.5) afin de tester les effets « animal » et « muscle » sur :

- les différentes mesures de texture (dureté instrumentale sur viande crue et cuite, longueur de sarcomère) et,
- les caractéristiques du tissu conjonctif (quantité et solubilité du collagène, surface et longueur du réseau segmenté en histologie et en IRM).

Entraînement du jury d'analyse sensorielle

Afin d'établir la liste des attributs pertinents du profil sensoriel, une analyse de variance à une voie a été réalisée, au seuil de 5%, sur chaque attribut après chaque séance d'entraînement. Ces analyses ont permis d'éliminer les attributs ne permettant pas de discriminer de manière significative les différents types de muscles.

Cette analyse a ensuite été complétée par une analyse de variance à trois voies afin de tester la robustesse de l'effet muscle par rapport à l'effet juge et à l'interaction entre ces deux effets.

B.2.4.2 Analyse en composantes principales

Toutes les mesures effectuées sur les échantillons de l'étude ont fourni un très grand nombre de variables. Il était donc nécessaire de connaître les liaisons entre ces variables afin de ne pas conserver dans l'analyse des variables très corrélées. L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée afin de caractériser les liaisons entre les différents attributs du profil sensoriel ou entre les variables issues de l'analyse d'image. Elle a également été utilisée pour examiner les relations entre les mesures instrumentales et sensorielles de la dureté.

En effet l'ACP est une technique qui permet de faire la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables. Les composantes principales sont de nouvelles variables indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales, possédant une

variance maximale. Ces nouvelles variables permettent d'utiliser ensuite des analyses multivariées classiques comme l'analyse factorielle discriminante dans de meilleures conditions. En effet, toute l'information est décrite par un nombre plus restreint de variables synthétiques. Globalement l'ACP consiste à rechercher la direction suivant laquelle le nuage de points des observations s'étire au maximum. A cette direction correspond la première composante principale. La seconde composante principale est déterminée de telle sorte qu'elle soit la plus indépendante possible de la première ; elle est donc perpendiculaire à celle-ci. Ces deux composantes forment le premier plan principal. Cette opération est réitérée de manière à trouver toutes les composantes principales et plans expliquant le maximum de variance. Quand deux variables sont proches l'une de l'autre dans le plan principal, elles sont corrélées positivement. Lorsqu'elles sont diamétralement opposées, elles sont corrélées négativement. Enfin quand elles sont orthogonales, elles sont indépendantes. Les points d'observations sont également projetés sur le plan principal suivant les facteurs étudiés (dans notre cas : le type de muscle). Si une famille de points se distingue dans une région du plan alors la variable la plus proche de cette région est caractéristique de cette famille de points.

B.2.4.3 Modélisation de la relation entre l'organisation spatiale du périmysium et la texture de la viande cuite

La relation entre les variables de "texture" (C80cuit et tendreté sensorielle) et les variables "image" (surface ou longueur de réseau, variables de granulométrie des images des coupes histologiques et RMN) a été déterminée grâce à une série de traitements statistiques (Figure B-15). Une première étape a consisté en un tri des variables à proposer pour la modélisation qui ensuite a été réalisée par analyse générale discriminante (AGD).

Le but de AGD est de prédire l'appartenance d'un individu à un groupe qualitatif défini au préalable. Cette prédiction est faite à partir des variables mesurées sur cet individu. Les individus étant classés en groupes, l'AGD va créer de nouvelles variables appelées « facteurs discriminants » qui seront des combinaisons linéaires des variables initiales calculées pour séparer au mieux les groupes d'individus. Les facteurs discriminants sont calculés pour que la variance à l'intérieur du groupe soit minimale et que la variance entre les groupes soit maximale. Après le calcul des facteurs discriminants, les individus sont affectés aux différents groupes. Pour chaque individu, la distance qui le sépare des centres de gravité de chaque groupe est calculée. La comparaison du groupe d'affectation par rapport au groupe réel est un indicateur de qualité de la discrimination des groupes.

Tout d'abord les variables "image" ont dû être triées à cause du grand nombre de variables de granulométrie. Le premier critère de tri a consisté à exclure les variables de granulométrie présentant au moins 10 valeurs nulles parmi les 32 observations. Une seconde étape a consisté à regrouper les variables restantes de granulométrie par la méthode des k-moyennes selon leur corrélation deux à deux de manière à former des groupes de variables de tailles consécutives. La valeur associée au groupe de variables a été calculée suivant l'équation suivante :

$$G_{i-j} = G_i + G_{i+1} + \dots + G_{j-1} + G_j. \quad \text{Eq B-9}$$

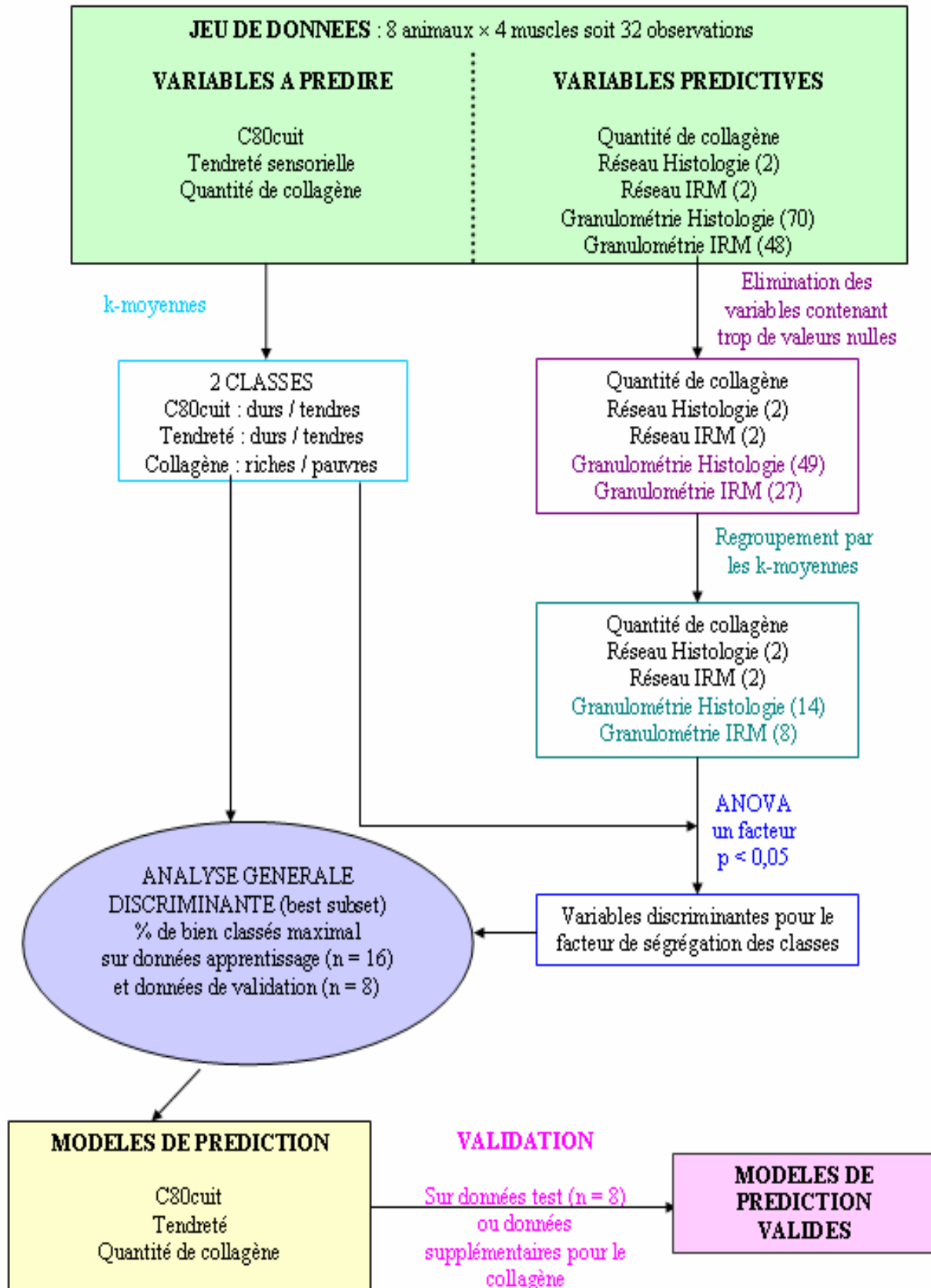
En parallèle, les échantillons ont été classés en deux groupes selon l'algorithme des k-moyennes, sur la base des valeurs de C80cuit, de tendreté et de quantité de collagène total.

Une ANOVA à une voie a été réalisée sur chaque variable prédictive (quantité de collagène, variables de réseau et de granulométrie mesurées en histologie et en IRM) selon le modèle variable prédite = classe, où la classe était un des deux groupes (dur contre tendre ou riche contre pauvre en collagène). Seules les variables discriminantes ($p < 0,05$) ont été utilisées pour étudier la relation entre les variables prédites.

La relation entre les variables prédites et les caractéristiques du tissu conjonctif a été déterminée par analyse générale discriminante (AGD). Les 32 observations ont été divisées au hasard en trois groupes : un groupe d'apprentissage ($n_{ap} = 16$), un groupe de validation ($n_{val} = 8$) et un groupe de test ($n_{test} = 8$). Le meilleur sous-groupe de variables a été sélectionné sur le jeu de données « apprentissage/validation », à l'aide d'un algorithme de validation croisée. Le taux de mauvais classement a été choisi comme critère principal de classement des modèles proposés. La performance du modèle choisi a également été éprouvée par le pourcentage d'individus bien classés dans le jeu de données « test ».

Cette étape de modélisation a été effectuée pour prédire l'appartenance d'un échantillon à une classe de C80cuit, tendreté sensorielle et quantité de collagène pour les deux niveaux de confiance de segmentation $\varepsilon = 40$ et 80%.

Figure B-15. Schéma récapitulant les étapes du traitement statistique mis en œuvre pour étudier les relations entre le tissu conjonctif et la texture de la viande.



RESULTATS ET DISCUSSION

C. ETUDE PRELIMINAIRE

Cette première phase avait pour objectif de valider les méthodes ainsi que le plan d'expérience nécessaires à l'étude. Il était nécessaire, en effet, de statuer sur plusieurs points : (i) le choix des muscles, réalisé à partir des données de la littérature devait être confirmé, (ii) les techniques de mesure devaient être validées, et (iii) les méthodes d'évaluation de la tendreté et le barème de cuisson de la viande devaient être définis.

C.1 CONTROLE DE L'ETAT DE MATURATION ET DE CONTRACTION

Dans le but de mettre en évidence le rôle du tissu conjonctif sur la tendreté, l'influence des myofibres devait être contrôlée et minimisée. Dans ce but, les six muscles choisis (BF, GT, IS, LT, PP et RF) ont été maturés huit jours *post mortem*. Leur état de maturation a été évalué en mesurant la valeur de la contrainte en compression à 20% de déformation, caractéristique de la résistance mécanique des myofibres (Lepetit et Culioli, 1994). A huit jours *post mortem*, aucune différence entre muscle n'a pu être mise en évidence ($p > 0,05$) (Tableau C-1). Les valeurs du C20 cru étaient comprises entre 6,5 et 12,5 N / cm², dénotant une maturation inachevée. Elles étaient notamment élevées pour quatre des six muscles (IS, BF, GT, PP), car très supérieures au seuil de 4 N/cm² considéré comme le C20 cru maximal d'une viande complètement maturée (Lepetit et Buffiere, 1993). Ainsi une maturation prolongée supérieure à huit jours devra être effectuée pour assurer une résistance myofibrillaire minimale et à peu près équivalentes entre muscles et donc permettre de mesurer les effets stricts du tissu conjonctif sur la tendreté de la viande.

Tableau C-1. Contraintes moyennes en compression à 20% de déformation sur des échantillons crus.

	Contrainte à 20% (N/cm ²)
<i>Longissimus thoracis</i> (LT)	6,5 ± 4,1 <i>a</i>
<i>Rectus femoris</i> (RF)	6,5 ± 3,8 <i>a</i>
<i>Infraspinatus</i> (IS)	9,4 ± 3,7 <i>a</i>
<i>Biceps femoris</i> (BF)	10,5 ± 6,5 <i>a</i>
<i>Gastrocnemius</i> (GT)	11,0 ± 3,2 <i>a</i>
<i>Pectoralis profundus</i> (PP)	12,2 ± 4,9 <i>a</i>

Pour contrôler l'absence de contraction au froid, synonyme de déroulement anormal du processus de refroidissement des carcasses, la longueur de sarcomère des échantillons a été mesurée. Elle est comprise entre 1,8 et 2,4 μm (Tableau C-2). Il n'existe pas de différence significative entre les différents types de muscle ($p > 0,05$), sauf entre IS et PP. Les valeurs observées sont globalement élevées par rapport à la valeur de référence de 2,0 μm (Wheeler *et al.*, 2000). En effet, leurs mesures ont été effectuées à 24 h *post mortem*, alors que les nôtres ont été réalisées à 21 jours *post mortem*. Or il a été montré que la longueur de sarcomère diminuait entre l'abattage et 24h, puis augmentait de nouveau après l'établissement de la *rigor mortis* (Wheeler et Koohmaraie, 1994). Les échantillons n'ont donc vraisemblablement pas subi de contraction dans les conditions d'abattage et de réfrigération utilisées. Seul le muscle IS présente une valeur plus faible par rapport aux autres, mais elle reste cependant sensiblement supérieure à la valeur de 1,6 μm en dessous de laquelle des problèmes de durcissement de la viande sont généralement observés (Purchas, 1990).

La comparaison avec les données de la littérature (Tableau C-3) permet de confirmer que le muscle PP possède des sarcomères plus longs que ceux des autres muscles. En revanche pour les autres types de muscle, aucun classement consensuel n'est proposé dans la littérature.

Tableau C-2. Longueurs de sarcomères moyennes mesurées en microscopie optique.

	Longueur de sarcomère (μm)
IS	$1,81 \pm 0,44$ <i>a</i>
LT	$2,10 \pm 0,39$ <i>ab</i>
RF	$2,12 \pm 0,06$ <i>ab</i>
BF	$2,20 \pm 0,45$ <i>ab</i>
GT	$2,33 \pm 0,32$ <i>ab</i>
PP	$2,36 \pm 0,53$ <i>b</i>

Tableau C-3. Mesures de longueur de sarcomères exprimées en μm des différents types de muscles relevées dans la bibliographie.

	Herring <i>et al.</i> , 1967b	Dransfield, 1977	Mc Keith <i>et al.</i> , 1985	Torrescano <i>et al.</i> , 2003
BF	1,8-2,3	2,09	1,81	1,6
GT	/	1,83	/	/
IS	2,4-2,6	2,86	2,45	2,21
LT	2-2,5	1,43	2,10	1,95
PP	/	3,08	2,81	2,65
RF	/	1,90	2,37	/

C.2 TENEUR EN COLLAGÈNE

Les différents muscles étudiés, choisis notamment pour leur teneur en collagène différente, forment quatre groupes (Tableau C-4). Les muscles PP et BF sont très riches en collagène et à l'opposé, les muscles LT, IS et RF en contiennent le moins, le muscle GT étant en position intermédiaire.

Tableau C-4. Teneurs en collagène mesurées sur les différents types de muscle, exprimées en mg d'hydroxy-proline par g de muscle frais. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).

Teneur en collagène	
PP	1,13 \pm 0,13 <i>a</i>
BF	1,05 \pm 0,07 <i>ab</i>
GT	0,88 \pm 0,19 <i>bc</i>
RF	0,76 \pm 0,14 <i>cd</i>
IS	0,74 \pm 0,07 <i>cd</i>
LT	0,58 \pm 0,04 <i>d</i>

Les teneurs en collagène mesurées sont proches de celles publiées par Dransfield (1977) et Torrescano *et al.* (2003) à l'exception de celle du muscle BF trouvée plus faible par ces derniers auteurs. (Tableau C-5). Des valeurs comparables, excepté pour les muscles IS et RF, ont été obtenues par d'autres auteurs (Jeremiah *et al.*, 2003a ; Mc Keith *et al.*, 1985). Or ces deux muscles présentent en leur centre une épaisse trame d'aponévrose que nous avons préféré ôter alors que ces auteurs ont dû la conserver pour leurs mesures. En effet, elle peut aisément être écartée par le consommateur avant consommation du morceau de viande. De ce fait, elle n'interfère pas dans le processus de mastication et ne doit pas être prise en compte

lors du calcul de la relation entre la teneur en collagène des échantillons et la tendreté de la viande.

Tableau C-5. Revue bibliographique de la concentration en collagène exprimée en mg d'hydroxy-proline par g de muscle frais

	Dransfield, 1977	Mc Keith <i>et al.</i> , 1985	Jeremiah <i>et al.</i> , 2003a	Torrescano, <i>et al.</i> 2003
BF	1,14	1,20	1,12	0,72
GT	0,71	/	/	/
IS	0,79	2.22	2,52	0,98
LT	0,64	0,58	0,56	0,51
PP	1,13	1.09	1,12	0,96
RF	0,74	1,74	1,51	/

C.3 MESURES MECANQUES DE DURETE

C.3.1 Compression à 80% sur viande crue

Les valeurs obtenues pour le test de compression sur viande crue à 80% de déformation (C80) étaient comprises entre 28 et 86 N/cm² (Tableau C-6). Peu d'études ont permis de mesurer cette valeur de résistance mécanique sur de la viande crue. Ainsi parmi nos six muscles, seuls le LT et le RF sont documentés. Pour le LT, nos valeurs sont proches de celles déjà publiées. En effet, à 7 jours *post mortem* (durée de maturation comparable à la nôtre égale à 8 jours), Monson *et al.* (2004) ont publié des valeurs comprises entre 27 et 47 N/cm² en fonction de la race et Sanudo *et al.* (2004) ont proposé des valeurs entre 25 et 49 N/cm² en faisant varier la race et le poids à l'abattage. Pour le RF, notre mesure de C80cru est légèrement supérieure à celle proposée par Denoyelle et Lebihan (2004) (44 contre 51 N/cm²). Cependant leur échantillons ont été maturés 10 jours *post mortem*, entraînant un surcroît d'attendrissage de la viande.

Tableau C-6. Contraintes moyennes en compression à 80% de déformation sur viande crue (C80 cru). Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).

	C80cru (N/cm ²)
BF	87,7 ± 27,5 <i>a</i>
PP	85,9 ± 31,4 <i>a</i>
GT	56,3 ± 19,4 <i>ab</i>
RF	51,3 ± 20,6 <i>ab</i>
IS	44,7 ± 5,4 <i>ab</i>
LT	27,9 ± 7,5 <i>b</i>

Les mesures de compression sur viande crue à 80% de déformation séparent les muscles en trois groupes comprenant les muscles BF et PP significativement différent du LT ($p < 0,05$). Les trois autres muscles (GT, RF, IS) présentent des valeurs de C80cru intermédiaires. Les muscles sont classés selon le même ordre que celui basé sur la teneur en collagène. En effet, Bouton et Harris (1972) avaient montré que la mesure de la contrainte à 80% en compression sur viande crue reflétait la part de la dureté reliée au tissu conjonctif et donc était très liée à la teneur en collagène. Ceci est confirmé par la très forte corrélation entre nos valeurs de C80cru et la teneur en collagène ($R^2 = 0,96$) (Figure C-1).

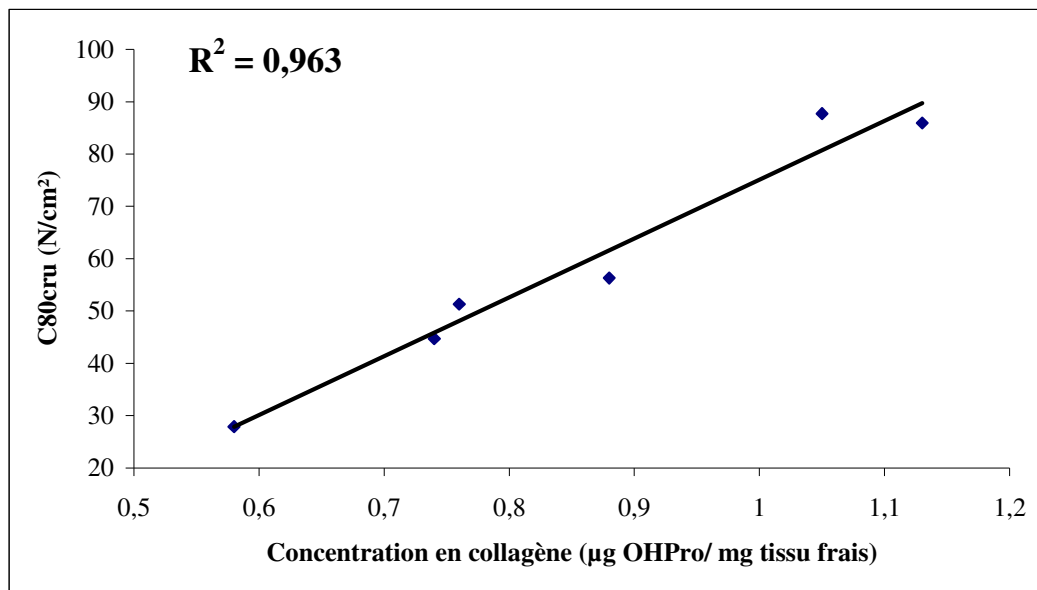


Figure C-1. Relation entre teneur en collagène et la dureté de la viande crue estimée par la contrainte en compression longitudinale à 80% de déformation.

C.3.2 Pertes à la cuisson et cisaillement sur viande cuite

Après 15 minutes de cuisson, les pertes totales (décongélation et cuisson) ont été de l'ordre de 15 % (Tableau C-7), sauf pour le muscle GT, qui a perdu significativement moins de jus à la cuisson ($p < 0,05$).

Après 15 min de cuisson, le muscle PP très dur d'un côté et les muscles LT et IS tendres de l'autre formaient les extrêmes, tandis que les muscles BF, GT et RF étaient intermédiaires, en terme de force maximale de cisaillement (Tableau C-7). Pour l'énergie à la rupture, seul le muscle PP se distinguait comme très dur ($p < 0,05$).

Tableau C-7. Pertes à la cuisson et mesures mécaniques de dureté en cisaillement après cuisson des échantillons pendant 15 minutes à 65 °C. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$). Les échantillons sont classés par ordre décroissant de force maximale de cisaillement.

	Pertes d'eau (%)	Force maximale de cisaillement (N)	Energie à la rupture (J)
PP	12,2 <i>ab</i>	114,4 <i>a</i>	0,53 <i>a</i>
BF	14,1 <i>a</i>	85,5 <i>ab</i>	0,33 <i>b</i>
GT	8,3 <i>b</i>	77,8 <i>ab</i>	0,39 <i>b</i>
RF	14,5 <i>a</i>	70,3 <i>ab</i>	0,33 <i>b</i>
LT	16,4 <i>a</i>	60,8 <i>b</i>	0,36 <i>b</i>
IS	17,0 <i>a</i>	59,6 <i>b</i>	0,36 <i>b</i>

Tableau C-8. Pertes à la cuisson et mesures mécaniques de dureté en cisaillement après cuisson des échantillons pendant 30 minutes à 65 °C. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$). Les échantillons sont classés par ordre décroissant de force maximale de cisaillement.

	Pertes d'eau (%)	Force maximale de cisaillement (N)	Energie à la rupture (J)
PP	15,2 <i>a</i>	88,0 <i>a</i>	0,58 <i>a</i>
BF	17,6 <i>a</i>	60,8 <i>b</i>	0,38 <i>b</i>
GT	12,6 <i>a</i>	54,2 <i>b</i>	0,39 <i>b</i>
IS	19,2 <i>a</i>	51,6 <i>b</i>	0,45 <i>ab</i>
LT	19,3 <i>a</i>	42,9 <i>b</i>	0,37 <i>b</i>
RF	18,2 <i>a</i>	34,9 <i>b</i>	0,31 <i>b</i>

Tableau C-9. Revue bibliographique de la force de cisaillement mesurée sur viande cuite 70°C à cœur avec une cellule de Warner-Bratzler, exprimée en N, sur différents muscles. Des lettres différentes signifient une différence significative ($p < 0,05$).

Mc Keith <i>et al.</i>, 1985	Belew <i>et al.</i>, 2003
PP (62,2) <i>d</i>	PP (50,2)
BF (53,9) <i>d</i>	BF (38,6)
LT (37,1) <i>bc</i>	GT (38,5)
RF (36,1) <i>bc</i>	RF (34,9)
IS (32,2) <i>ab</i>	LT (34,3)
	IS (22,5)

Après 30 minutes de cuisson, les pertes d'eau étaient sensiblement plus élevées qu'après 15 minutes de cuisson (Tableau C-7 et Tableau C-8). Cependant, aucune différence significative n'était notée entre types de muscle ($p > 0,05$). Toutefois, les muscles IS et LT présentaient des valeurs de pertes d'eau totale (décongélation et cuisson) plus élevées que les autres muscles (Tableau C-8).

Les différences de pertes d'eau entre types de muscle peuvent être expliquées par des différences de type métabolique (Monin et Ouali, 1991). En effet les muscles oxydatifs, comme l'IS, présentent un meilleur potentiel de rétention d'eau (Monin et Ouali, 1991). Cependant nos résultats ne corroborent pas cette conclusion de la littérature puisque le muscle IS (le plus oxydatif de notre série) a présenté les pertes les plus élevées.

Il faut toutefois prendre en compte le fait que les pertes à la cuisson sont fonction d'un très grand nombre de facteurs (Laroche, 1992). Ainsi, lors d'une cuisson à une température supérieure à 63°C, le pérимysium et l'endomysium se contractent, chassant de l'eau des myofibres au sein desquelles une partie des protéines contractiles ont été dénaturées dès la température de 50°C. De ce fait l'organisation spatiale du pérимysium, *i.e.* la forme tridimensionnelle des faisceaux de fibres musculaires, peut influencer les pertes d'eau à la cuisson (Lewis et Purslow, 1990). Ainsi un pérимysium plus ramifié, comme celui de l'IS, du LT ou du RF, pourrait exercer une pression plus forte sur les myofibres, car démultipliée par une plus grande surface de contact, et de fait entraîner des pertes de jus plus élevées.

L'allongement de la durée de cuisson de 15 à 30 minutes a eu pour conséquence une diminution significative ($p < 0,05$) de la force maximale de cisaillement, de même qu'un tassement des différences entre muscles. Seul le muscle PP présentait une force de cisaillement significativement plus élevée ($p < 0,05$). De plus, à l'exception du muscle RF dont la force maximale devenait la plus faible, l'ordre des muscles était le même pour les deux durées de cuisson (Tableau C-8). La dénaturation, et donc la chute de résistance mécanique, du collagène qui débute à 60°C (Martens *et al.*, 1982), est plus avancée après 30 minutes de cuisson par rapport à une cuisson de seulement 15 minutes, ce qui a pour conséquence de limiter les différences inter muscles. En revanche, la dénaturation des myofibres à cette température s'opère plus rapidement que celle du collagène, n'entraînant pas, avec la durée de cuisson, une augmentation de dureté de la même amplitude. L'énergie nécessaire pour la rupture de l'échantillon après 30 min de cuisson n'a pas été significativement influencée par la durée de cuisson ($p > 0,05$), le muscle PP présentant toujours une énergie significativement ($p < 0,05$) plus élevée (Tableau C-8).

Nos valeurs de force de cisaillement après 30 min de cuisson étaient comprises entre 35 et 88 N, pour les muscles LT et PP, respectivement (Tableau C-8). Des valeurs similaires ont été obtenues par Mathonière *et al.* (2000). Ces auteurs ont obtenu une valeur moyenne égale à 71 N pour les muscles *Semitendinosus* (ST) et *Semimembranosus* (SM), cuits 30 min à 60 °C. De même Mathevon *et al.* (1995) ont obtenu une force maximale de cisaillement moyenne égale à 69 N pour du muscle SM cuit dans les mêmes conditions.

Malgré la différence de cellule de test de cisaillement utilisée (cellule de Salé (1980) contre cellule de Warner-Bratzler dans la très grande majorité des études), nos mesures de force de cisaillement après 30 minutes de cuisson sont comparables à celles de la littérature (Tableau C-9). Les valeurs rapportées par Belew *et al.* (2003) sont globalement plus faibles que les nôtres ou celles de Mc Keith *et al.* (1985), à cause probablement d'une maturation plus longue des échantillons : *i.e.* 14 jours *post mortem* contre 8 jours pour notre étude et seulement 1 jour pour Mc Keith *et al.* (1985). Cependant le classement des muscles selon la force de cisaillement est très proche quelque soit l'étude considérée. Nos mesures placent le muscle PP comme le muscle le plus dur, tout comme celles de Mc Keith *et al.* (1985) et de Belew *et al.* (2003). Pour le muscle BF, notre mesure est équivalente à celle de Mc Keith *et al.* (1985). Le muscle GT n'a été étudié que par Belew *et al.* (2003), qui ont obtenu une valeur plus faible, mais le même classement des muscles. Les valeurs mesurées pour les muscles LT et RF correspondent aux données de la bibliographie, plaçant ces muscles dans la catégorie des muscles les plus tendres.

C.4 CONCLUSIONS

C.4.1 Choix des muscles

Cette étude préliminaire nous a permis de valider le choix des muscles utilisés pour la suite de l'étude. Ainsi, il est important par exemple de déterminer si le muscle IS doit être considéré avec ou sans sa trame conjonctive centrale, puisque celle-ci semble avoir une forte influence sur la teneur en collagène et sur la dureté de ce muscle. Nous avons décidé pour les raisons invoquées précédemment de ne pas la conserver. De plus, Belew *et al.* (2003) ont mis en évidence des variations significatives de la force de cisaillement selon l'emplacement de l'éprouvette dans le muscle. Nous avons, en conséquence, choisi de prélever les échantillons toujours au même endroit. Pour cela, les muscles entiers ont été prélevés, et un plan d'échantillonnage a été réalisé à partir de repères anatomiques. Comme certains muscles, tels les muscles GT et RF, ne présentent pas de zones homogènes suffisamment larges pour effectuer l'ensemble des mesures, nous avons limité notre choix aux muscles BF, IS, LT et PP.

C.4.2 Evaluation de la dureté

La mesure de la contrainte en compression à 20% de déformation a montré que huit jours de maturation n'étaient pas suffisants pour éliminer les différences de résistance mécanique des myofibres liés à des différences de vitesse de maturation muscles. Pour la suite de l'étude, la durée de maturation a été prolongée.

De plus une durée de cuisson de seulement 15 minutes est apparue trop courte pour obtenir une dénaturation homogène de la viande. Une cuisson plus longue de 30 minutes a donc été retenue, et ce d'autant que cette durée correspond mieux aux pratiques culinaires (cuisson en rôti) de la viande bovine.

Le test de mesure de la dureté en cisaillement sur la viande cuite ne semble pas être adapté pour mettre en évidence des différences entre les types de muscles. Nos résultats ont d'ailleurs corroboré ceux de la littérature. En effet plusieurs études ont montré que, malgré les différences de tendreté évaluée par un jury de dégustateurs, la force de cisaillement diffèrait peu entre les types de muscles (Harris et Shorthose, 1988 ; Shackelford *et al.*, 1995) ou plus récemment (Rhee *et al.*, 2004). Ainsi un test en compression, plus sensible aux variations de dureté liées au tissu conjonctif a été considéré plus approprié, sous réserve d'une validation par une mesure de référence comme un profil de texture sensoriel.

D. L'OUTIL D'ANALYSE D'IMAGE

L'originalité de notre étude repose sur l'étude de l'organisation spatiale du périnysium à plusieurs échelles. Dans ce but, deux modalités d'imagerie ont été employées :

- l'histologie qui a permis de visualiser les faisceaux primaires et secondaires, délimités par le périnysium fin au sein d'un champ de vue limité à 2 cm²
- l'IRM qui a donné accès à une échelle supérieure, macroscopique, permettant d'observer les faisceaux tertiaires et quaternaires dans un champ de vue allant jusqu'à 10 cm de côté. Ces derniers sont couramment désignés comme étant le grain de la viande, qui se distingue à l'œil nu.

Bien que très différentes, ces modalités d'acquisition ont produit des images de muscle présentant des propriétés comparables. Intrinsèquement ces images présentaient des histogrammes unimodaux. Par ailleurs, extrinsèquement, ces images sont bruitées et ont un fond hétérogène. En histologie, ces hétérogénéités sont dues principalement à la qualité du capteur CCD et aux variations de coloration et d'éclairage. Pour l'IRM, elles sont liées essentiellement aux imperfections du champ statique B_0 et du champ excitateur/récepteur B_1 .

A partir de ces images, l'objectif était de segmenter le tissu conjonctif périnysial afin d'analyser non seulement le réseau formé, mais aussi la granulométrie des faisceaux de myofibres qu'il délimitait. Faute d'outils validés, il fallait donc développer une méthode de segmentation. La stratégie que nous avons mise en oeuvre a consisté à utiliser une méthode simple et rapide, que nous avons optimisée et validée.

Dans ce contexte, la première étape a consisté à choisir une méthode de segmentation répondant aux spécificités de nos images. Ne possédant pas de modèle fiable de l'objet à segmenter, aucune approche « modèle » ou « top-down » ne pouvait servir de base à notre outil. De plus il était difficile d'établir une description morphologique précise du tissu conjonctif intramusculaire à cause de son organisation très diverse. Une approche « pixels » ou « bottom-up » semblait donc plus adaptée. Ces approches calculent des attributs de bas niveau pour ensuite les fusionner. Elles opèrent grâce à des critères d'agrégation d'information exigeant une connaissance de l'objet à segmenter quant à son intensité, sa forme, sa position ou son mouvement. Ne souhaitant pas utiliser d'*a priori* sur la position ou la forme du périnysium, les méthodes de seuillage, tenant compte de l'intensité, ont été privilégiées. De plus, le seuillage est particulièrement recommandé sur des images à fort contraste comme celles que nous étudions. Cependant le contexte unimodal de l'histogramme des images

rendait inopérantes les méthodes de seuillage courantes (Otsu, 1979 ; Glasbey, 1993). Seule celle développée par Rosin (2001) est adaptée au contexte unimodal. De plus, il semblait essentiel d'utiliser une méthode de seuillage validée par rapport à la vérité-terrain. Cette expression est la traduction du terme anglophone « ground truth », couramment utilisé pour désigner la vérité issue des observations (d'où le terme de terrain). Elle exprime l'expertise des juges et de ce fait s'oppose à la vérité absolue. Ainsi la construction de cartes probabilistes de référence s'est imposée. A partir de celles-ci, la méthode de seuillage par référence à des cartes probabilistes (Probabilistic maps thresholding ou PMT) a été mise au point.

D.1 SEUILLAGE PAR REFERENCE A DES CARTES PROBABILISTES

Les cartes de référence construites sont dites probabilistes car l'appartenance d'un pixel au périnysium n'est pas binaire mais associée à une probabilité. Un pixel noir (0) a une probabilité nulle d'appartenir au périnysium (aucun juge ne l'a désigné) et un pixel blanc (255) a une probabilité maximale (tous les juges l'ont désigné) d'appartenir au périnysium. Les cartes de référence (Figure D-1) renseignent sur la localisation du tissu conjonctif. En outre, l'intensité du pixel renseigne sur la confiance qu'il est possible d'accorder à un point appartenant au périnysium. En effet, plus le consensus entre les juges est élevé, plus le degré d'appartenance du pixel à la classe périnysium est important. Après seuillage, différentes images ont été obtenues selon la valeur du niveau de confiance ε (Figure D-1).

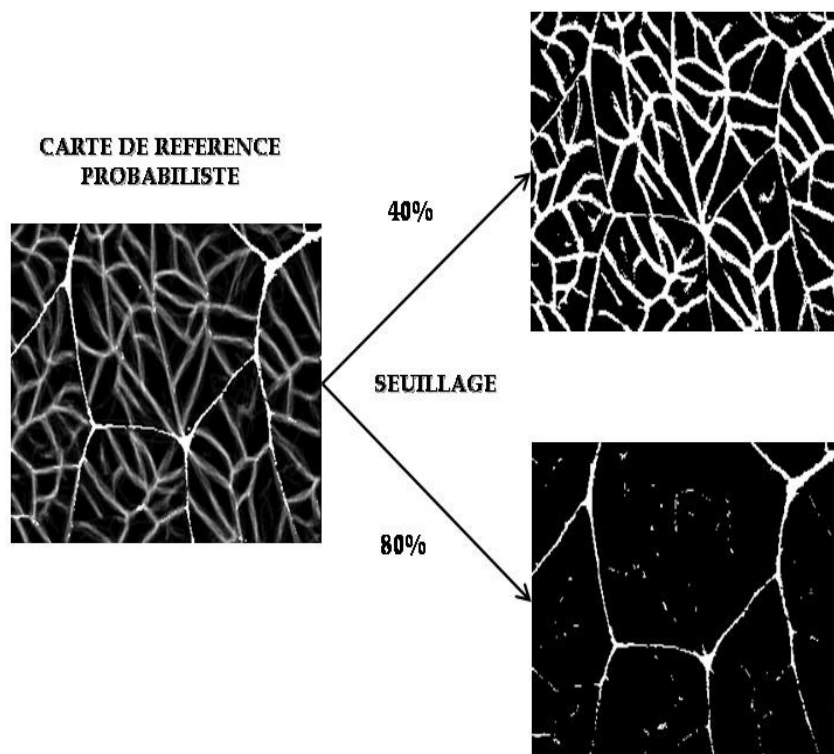


Figure D-1. Carte de référence d'une coupe histologique de muscle, qui fournit la probabilité d'appartenance du pixel à la classe « périnysium » et résultats du seuillage pour deux niveaux de confiance $\varepsilon = 80\%$ et 40% .

En pratique, la probabilité d'appartenir au réseau augmente avec le contraste et donc avec l'épaisseur du tissu conjonctif. En effet en histologie, le contraste entre le tissu conjonctif et les fibres diminue avec l'épaisseur, la quantité de colorant fixé étant proportionnelle à la quantité de collagène et à la densité des fibres de collagène dans le tissu conjonctif (Lopez De Leon et Rojkind, 1985). En IRM, le contraste relatif est lié à la quantité variable de tissu conjonctif dans un voxel donné (Bonny *et al.*, 2000) et à sa nature (chap. F.3). L'épaisseur des segments seuillés est directement reliée à la valeur de ϵ sélectionnée.

Pour chaque image test correspondant à une carte de référence, un seuil optimal a été déterminé à chaque niveau de confiance. L'image test a été seuillée à différents niveaux de gris et comparée avec sa carte de référence seuillée à un niveau de confiance donné. Cette comparaison a permis de définir deux termes d'erreur Eoo et Eob. Eoo représentait l'erreur commise sur l'objet à segmenter (le réseau de périnysium) et Eob constituait l'erreur commise sur le fond (les myofibres). La moyenne de ces deux termes définissait E, évaluant la performance globale de la segmentation. Eoo et Eob évoluaient de manière opposée, et E atteignait un minimum correspondant au meilleur compromis entre Eoo et Eob, désignant le seuil optimal de chaque image test.

L'objectif était de modéliser l'évolution du seuil optimal pour un niveau de confiance donné à partir des paramètres calculés sur l'histogramme de l'image. Ainsi la méthode de seuillage s'adaptait au contexte de l'image. Dans ce but, la méthode de régression linéaire multiple a été utilisée pour créer des règles de seuillage.

Le seuil optimal croît quand ϵ décroît, ce qui correspond à l'extraction des objets les plus fins caractérisés par des niveaux de gris élevés (*i.e.* des pixels avec une faible probabilité d'appartenir au tissu conjonctif) (Tableau D-1).

Pour les images de coupes histologiques, le seuil optimal (t^*) a été obtenu par combinaison linéaire de la moyenne et de l'écart-type ou du coefficient d'asymétrie (Tableau D-1). Les modèles obtenus pour chaque ϵ (de 30 à 80%) étaient très informatifs ($0,86 \leq R^2 \leq 0,99$). Pour des niveaux de confiance élevés (70 à 80%) qui correspondaient à la segmentation du réseau épais, l'erreur commise par le modèle, supérieure à 3 niveaux de gris, était plus forte que pour des ϵ faibles (et le R^2 était inférieur). Dans ce cas, le nombre de pixels à segmenter était faible et les courbes de Eoo et Eob variaient plus rapidement en fonction du seuil choisi. Ainsi à un haut niveau de confiance, la courbe de E formait un plateau entraînant une plus grande erreur sur la détermination de t^* (Figure D-2). Heureusement, la qualité de la segmentation était dans ce cas moins sensible au choix du seuil grâce au fort contraste entre

les myofibres et le tissu conjonctif. De plus l'erreur du modèle était inférieure à la largeur du plateau formé par E.

Pour les images en RMN, les règles de seuillage étaient obtenues par combinaison linéaire de la moyenne et du coefficient d'asymétrie à 30 et 40%, et de la moyenne et la variance pour les autres niveaux de confiance (Tableau D-2). Ces modèles étaient également très informatifs ($0,94 \leq R^2 \leq 0,99$). La moyenne étant un paramètre de position, son coefficient multiplicateur était inférieur à 1, plaçant donc le seuil à gauche du mode principal. La variance ou le coefficient d'asymétrie sont des paramètres décrivant la dispersion du mode principal. Leur présence dans le modèle a permis d'ajuster le seuillage en fonction de la dispersion du mode des fibres qui prédominait sur le réseau de tissu conjonctif. Comme pour les images en histologie, l'erreur moyenne des modèles augmentait avec le niveau de confiance, à cause du plus faible nombre de pixels à segmenter.

Les règles de seuillage obtenues peuvent être généralisées sous la forme

$$t^* = A.m + B.\sigma \quad \text{Eq D-1}$$

avec t^* le seuil optimal, A et B des coefficients empiriques et m, la moyenne et σ , l'écart-type. Elles sont proches du modèle heuristique de Niblack (1985)

$$t^* = m + k.\sigma \quad \text{Eq D-2.}$$

Les cartes de référence sont des étalons nécessaires pour l'étape de calibration de la méthode, conduisant à la détermination des paramètres A et B des règles de seuillage. Pratiquement, A est approximativement égal à 1 ; ce qui localise le seuil sur le mode principal de l'histogramme et B donne la position sur le coté du mode. Comme le tissu conjonctif est plus sombre que les myofibres, le seuil est situé à gauche du mode et B doit être négatif. Quand ϵ décroît le seuil augmente et donc B doit diminuer.

Les valeurs d'erreur en IRM paraissent très élevées par rapport à celles en histologie. Cependant ce sont des valeurs absolues et la dynamique en IRM est beaucoup plus grande qu'en histologie. En effet, les images RMN sont codées sur 16 bits, soit une dynamique maximale de 65536 niveaux de gris contre 8 bits et 256 niveaux de gris pour les images histologiques. Ainsi relativement à la dynamique des images, l'erreur en histologie variait de 0,5 à 2,5% et en IRM de 0,05 à 0,4%. L'erreur des règles pour PMT(IRM) était donc inférieure à celles commise sur les images histologiques.

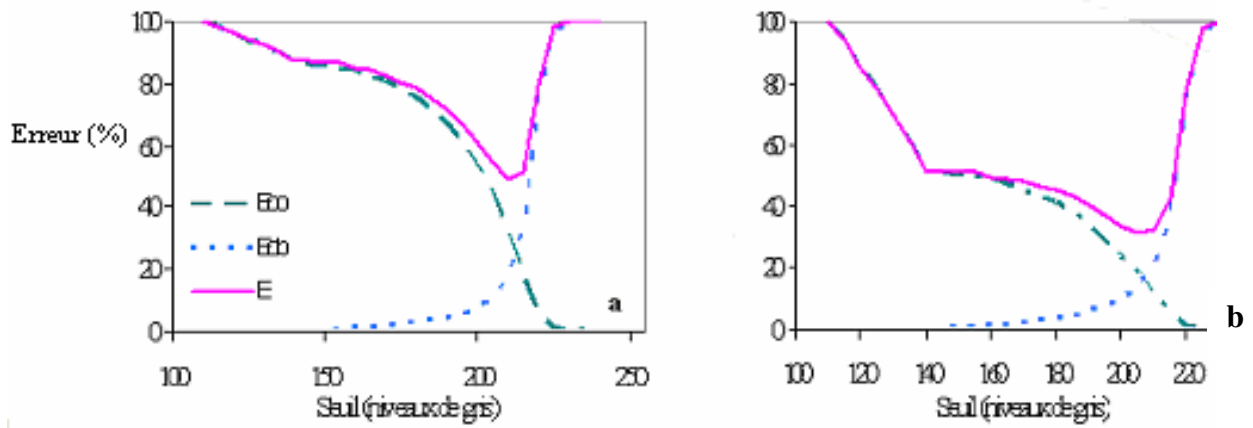


Figure D-2. Evolution des erreurs en fonction du seuil pour un seuillage de la carte de référence à 30% (a) et 80% (b). E_{oo} correspond à l'erreur faite sur le réseau, E_{ob} l'erreur faite sur les fibres et $E = E_{oo} + E_{ob}$. A 80%, la courbe de E forme un palier plus large qu'à 30%.

Tableau D-1. Modèles de régression linéaire définissant les règles de seuillage optimal en histologie.

Niveau de confiance ϵ (%)	Coefficients des règles de seuillage				
	Moyenne	Ecart-type	Aplatissement	Constante (niveau de gris)	R ²
30	1,04	0,27	/	- 10,86	0,995
40	1,02	0,27	/	- 8,98	0,994
50	1,05	/	- 1,77	- 16,40	0,996
55	1,07	/	/	- 15,29	0,989
60	1,07	/	/	- 16,54	0,992
65	1,08	/	/	- 21,66	0,996
70	1,11	/	/	- 31,56	0,975
75	0,96	/	/	- 12,84	0,864
80	1,09	- 0,81	/	30,46	0,939
					1,29
					1,25
					1,19
					1,70
					1,40
					1,16
					3,05
					6,40
					4,56

Tableau D-2. Modèles de régression linéaire définissant les règles de seuillage optimal en IRM.

Niveau de confiance ε (%)	Coefficients des règles de seuillage				
	Moyenne	Variance	Aplatissement	Constante (niveau de gris)	R ²
30	0,843	/	- 304,3	- 243,7	0,990
40	0,759	/	- 348,5	211,9	0,999
50	0,865	11,5. 10-4	/	296,9	0,995
60	0,899	17,4. 10-4	/	- 113,7	0,974
70	0,947	23,5. 10-4	/	- 425,8	0,943
80	0,940	23,7. 10-4	/	- 361,3	0,941
					113
					36
					77
					175
					262
					270

D.2 VALIDATION

La validation de notre méthode (PMT) a été réalisée uniquement sur les images histologiques et s'est décomposé en deux volets. Tout d'abord, les performances du PMT ont été comparées à la méthode de Rosin (2001) (RT pour Rosin Thresholding), décrite pour le seuillage d'images possédant un histogramme unimodal. Pour cela les erreurs commises par les deux méthodes par rapport aux cartes de références ont été calculées aux différents niveaux de confiance possibles. Dans un second temps, nous avons comparé la quantité des pixels segmentés sur l'image (surface) et la quantité de collagène dosé sur la même coupe de muscle par une méthode histochimique, validant ainsi notre méthode par rapport à la vérité-terrain.

D.2.1 Comparaison à la méthode de Rosin

Les règles de seuillage du PMT dépendent du niveau de confiance ε , alors que la méthode RT s'adapte seulement au contexte de l'image et donne une valeur de seuil unique quelque soit la valeur de ε . Or la méthode PMT permet d'améliorer la segmentation des images pour des niveaux de confiance inférieurs à 70%. (Figure D-3). En effet, les performances des deux méthode de seuillage sont équivalentes pour $\varepsilon = 70\%$. Pour RT, Eoo (erreur sur le réseau) varie beaucoup en fonction du niveau de confiance et devient environ deux fois plus élevée que celle de PMT pour ε faible (Figure D-3). Cette méthode n'est donc pas sensible aux segments fins, qui sont extraits pour des niveaux de confiance inférieurs à 70%. De ce fait, la méthode RT est seulement adaptée à la segmentation du réseau épais. Pour les fibres (Eob), RT commet moins d'erreurs que PMT pour $\varepsilon < 70\%$ (Figure D-3), mais la valeur de E pour PMT reste globalement inférieure. Eob maintient une valeur faible quelque soit le niveau de confiance pour RT car cette méthode ne prend pas le risque de segmenter des pixels faiblement contrastés. De plus les pixels générant ces erreurs de segmentation correspondent aux zones mal contrastées de l'image à cause des problèmes d'hétérogénéité du fond, présentes quelque soit le niveau de confiance. Pour PMT, Eob diminue de 20 à 2% en fonction du niveau de confiance. Pour ε inférieur à 70%, PMT prend plus de risques puisqu'il segmente des pixels ayant généré un consensus faible des juges, car appartenant à du périnysium fin et présentant un contraste plus faible avec les myofibres. Ainsi une partie du périnysium situé dans des zones où le fond est hétérogène est segmentée. L'erreur commise sur le réseau (Eoo) semble ne pas pouvoir descendre en dessous d'un palier (environ 10%),

pour ε inférieur à 70% ; ce palier étant même plus élevé que les valeurs de E_{00} obtenues avec RT. Le calcul de t^* et donc les règles de seuillage pourrait donc être amélioré.

L'index de performance E décroît quand le niveau de confiance croît c'est-à-dire la qualité de la segmentation augmente (Figure D-3). En effet, pour les valeurs élevées de ε , seul le périnysium épais à haut consensus et fort contraste est segmenté. Si la performance de PMT (en terme de pourcentage d'erreur) n'est pas fortement améliorée en diminuant ε par rapport à RT, une légère différence sur le critère E peut impliquer une forte différence de segmentation. En effet, la différence pour E entre RT et PMT pour $\varepsilon = 60\%$ est très faible (Figure D-3), mais la différence entre les segmentations d'une même image est forte (Figure D-4). Le nombre de pixels appartenant au réseau conjonctif le plus fin segmenté grâce à PMT est réduit comparé au volume de l'image, mais ces pixels apportent une information de grande valeur quant à la hiérarchisation du réseau (Figure D-4), comme l'a également montré Baradez (2004).

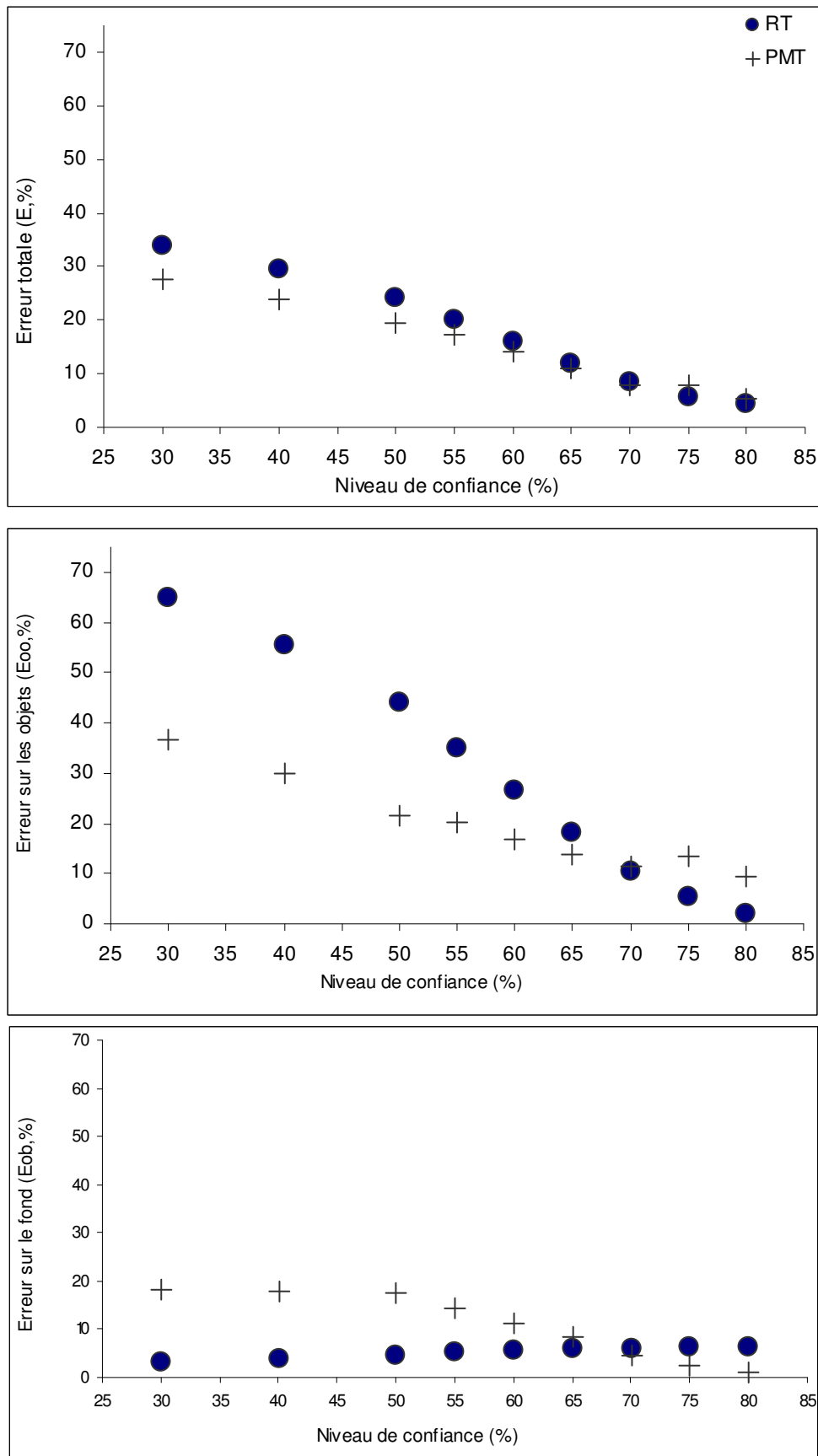


Figure D-3. Pourcentages d'erreur de segmentation des images histologiques avec la méthode de Rosin (RT) et la méthode PMT. (a) E est la moyenne de Eoo et Eob, (b) Eoo est l'erreur sur le réseau, et (c) Eob est l'erreur sur les fibres.

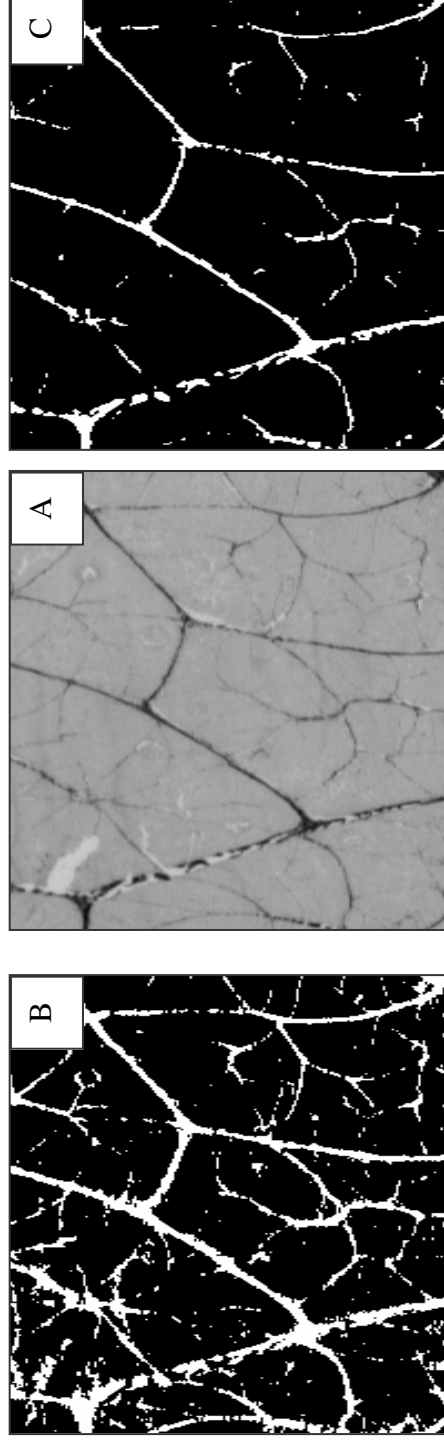


Figure D-4. Comparaison des performances de segmentation entre l'algorithme de Rosin (RT) et la méthode PMT pour $\varepsilon = 60\%$. Image originale (A), méthode PMT(B) et RT (C).

D.2.2 Comparaison à la quantité de collagène

Le second volet de validation de la méthode de segmentation PMT a consisté à confronter les mesures du périnysium segmenté à la vérité de terrain. Cette dernière a été évaluée par le dosage histo-chimique de la quantité de collagène contenue dans les coupes de muscle ayant servi à l'acquisition des images. Dans ce but, les surfaces du réseau segmenté à différents niveaux de confiance et les quantités de collagène ont été comparées. Les valeurs du coefficient de corrélation R obtenues sont significatives pour les valeurs de ε comprises entre 65% et 80% ($p < 0,05$). Il existe donc une relation linéaire entre la concentration en collagène des coupes déterminées histo-chimiquement et la surface occupée par les pixels segmentés par la méthode PMT pour des valeurs élevées de ε (Figure D-5). Le coefficient de corrélation décroît de manière marquée avec ε (Tableau D-3). Ces résultats indiquent que la concentration en collagène est reliée aux segments du réseau épais, qui représente la plus forte population de pixels. De plus, quand ε décroît la détection de pixels parasites augmente à cause de l'erreur commise par la méthode PMT aux faibles niveaux de confiance. En effet Eob se situe entre 15 et 20% pour ε compris entre 30 et 55%. Par conséquent la segmentation de faux positifs fait également diminuer le coefficient de corrélation.

Tableau D-3. Valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R) entre la quantité de collagène déterminée sur coupes histologiques et la surface de périnysium segmentée sur les images des mêmes coupes histologiques.

Niveau de confiance ε (%)	30	40	50	55	60	65	70	75	80
R	0,26	0,40	-0,23	0,04	0,20	0,45	0,57	0,67	0,63

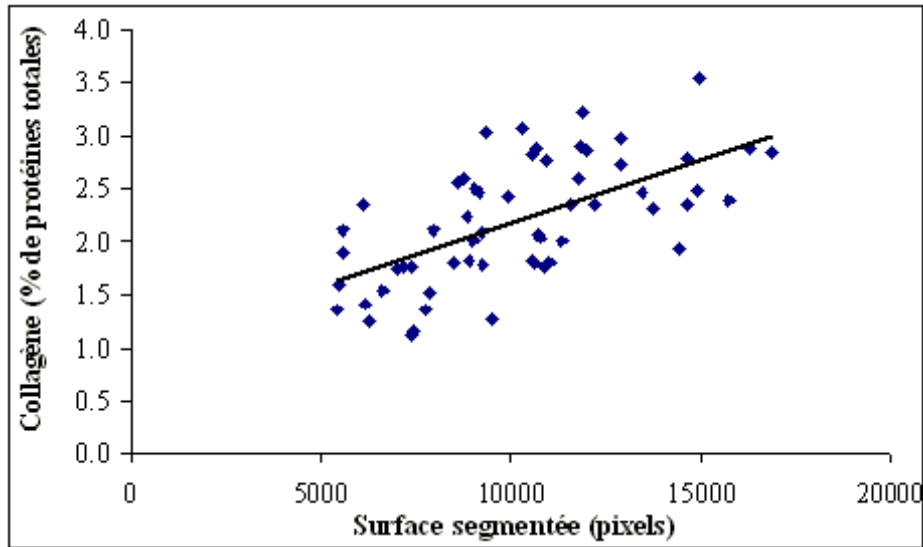


Figure D-5. Corrélation entre la surface de réseau segmentée pour $\varepsilon = 80\%$ et la teneur en collagène dosée sur les coupes musculaires.

La méthode PMT segmente efficacement le réseau conjonctif, comme le montre pour ε élevé les valeurs significatives ($p < 0,05$) du coefficient de corrélation entre la surface segmentée et la quantité de collagène mesurée par histochimie. Cependant le coefficient de corrélation diminue quand ε diminue de 70 à 55% (Tableau D-3), alors que les segments les plus fins s'ajoutent. De nombreuses sources d'erreur peuvent expliquer cette dépréciation de la corrélation. Tout d'abord, la technique de quantification chimique du collagène sur les coupes histologiques est peu précise, du fait des petites quantités de tissu et de collagène utilisées (entre 11 et 36 μg de collagène / mg de protéine). Par ailleurs, le mécanisme de fixation du colorant sur le collagène reste mal connu (Lopez De Leon et Rojkind, 1985). La densité et la composition des fibrilles de collagène, et ainsi la capacité de fixation du colorant, peut varier selon l'épaisseur des segments, paramètre dont on ne peut pas tenir compte dans le traitement des images. La surface occupée par les segments les plus fins est surestimée. En effet, la résolution spatiale des images (27 μm / pixel) est inférieure à l'épaisseur des segments les plus fins du réseau conjonctif, évalués précédemment à environ 10 μm par Bonny *et al.* (2000). Ces segments sont donc binarisés avec une épaisseur d'un pixel alors qu'ils sont en fait plus fins.

En conclusion, la méthode PMT est plus performante que RT. Elle permet de s'adapter à l'image mais aussi de paramétrer le niveau de segmentation à l'aide du niveau de confiance ε . Ce paramètre permet de segmenter le réseau de périnysium fin et donc d'obtenir une information importante sur l'organisation du périnysium, alors que RT se limite au périnysium épais. De plus, la segmentation a été confrontée à la vérité de terrain, confirmant

que la surface du réseau segmentée était une bonne estimation de la quantité de tissu conjonctif.

D.3 EXTRACTION DE PRIMITIVES

La segmentation ne représente qu'une étape de l'analyse d'images. Il est nécessaire ensuite de caractériser l'organisation du réseau conjonctif extrait à l'aide de primitives. Trois primitives ont été en l'occurrence calculées : la surface, la longueur du réseau squelettisé et l'épaisseur moyenne. La mesure de surface a été validée à l'aide du dosage de collagène sur coupe, comme apportant une information sur la quantité de tissu conjonctif dans l'image (chap. D.2.2). La longueur apporte une information sur le degré de ramification du réseau. En effet, plus le réseau présente de ramifications, plus le squelette du réseau sera long. L'épaisseur moyenne du réseau a été estimée par le rapport entre surface et longueur. Cependant cet estimateur doit être validé en le comparant avec l'épaisseur du périmysium secondaire mesurée manuellement sur des coupes histologiques. L'avantage de la méthode de segmentation PMT est d'être paramétrée par le niveau de confiance accordée à la segmentation. Il faut, cependant, déterminer les niveaux de segmentation à employer dans notre étude. Pour cela les variations de la surface de réseau segmentée en fonction de ε ont été étudiées. Par ailleurs, l'IRM a permis d'acquérir un grand nombre de coupes sur un même échantillon. Il a donc été nécessaire de déterminer si toutes ces coupes apportaient des informations comparables.

D.3.1 Estimation de l'épaisseur

L'épaisseur, ne pouvant être mesurée directement à partir de la segmentation, a été estimée par le rapport surface (S) sur longueur (L). Cet estimateur S/L a été validé par comparaison avec l'épaisseur du périmysium, délimitant les faisceaux de fibres musculaires secondaires. Celle-ci a été mesurée manuellement sur des images de coupes histologiques en utilisant le protocole de Fang *et al.* (1999). La corrélation entre l'estimateur et la mesure est significative ($p < 0,05$) ($R^2 = 0,60$) (Figure D-6). Cependant, le rapport S/L surestime l'épaisseur de périmysium d'un facteur 2 environ, comme en témoigne la pente de la droite de régression. Cette surestimation est liée au fait que le périmysium, au sein d'une image de coupes histologiques, n'a pas une épaisseur uniforme, comme le montre l'évolution de la surface en fonction du niveau de confiance (Figure D-7). Ainsi le rapport S/L ne peut donner qu'une estimation d'une épaisseur moyenne du périmysium, tenant compte majoritairement des trames épaisses qui ont plus de poids.

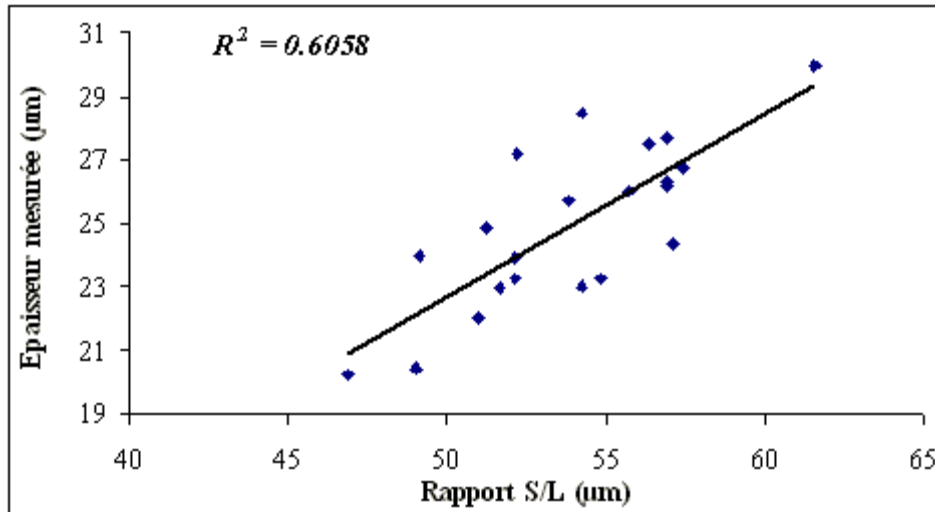


Figure D-6. Relation entre la mesure de l'épaisseur du périmysium entourant les faisceaux secondaires et le rapport surface sur longueur déterminé après une segmentation PMT d'images histologiques

D.3.2 Choix des niveaux de segmentation

La première primitive calculée est la surface du réseau. Celle-ci évolue selon les niveaux de confiance de la segmentation, mais aussi selon la modalité d'imagerie. En effet, sur les images histologiques, la surface segmentée augmente fortement quand ϵ varie de 80 à 50%. De 50 à 30%, un plateau est atteint (Figure D-7). Sur les images RMN, le même profil apparaît, cependant il est beaucoup moins marqué (Figure D-8). En effet la structure du tissu conjonctif segmenté apparaît moins hiérarchisée en IRM que sur les coupes histologiques. Les images RMN ne montrent qu'un réseau d'épaisseur uniforme alors qu'en histologie, le périmysium présente deux niveaux d'organisation d'épaisseur différente segmentés ou non selon ϵ . Compte tenu de ce profil, il n'est pas nécessaire de segmenter les images à tous les niveaux de confiance pour caractériser l'organisation du tissu conjonctif. Pour cette raison, une segmentation à deux niveaux, $\epsilon = 40$ et 80% a été choisie.

Sur les images histologiques, les courbes de surface des différents muscles sont assez regroupées alors qu'en IRM, le muscle IS se distingue nettement des trois autres. En effet, ce muscle présente une aponévrose d'épimysium qui traverse le muscle et qui n'a pas été ôtée sur les échantillons d'IRM. Ainsi la surface de tissu conjonctif mesurée à partir des images RMN d'IS a été surestimée d'environ 10%.

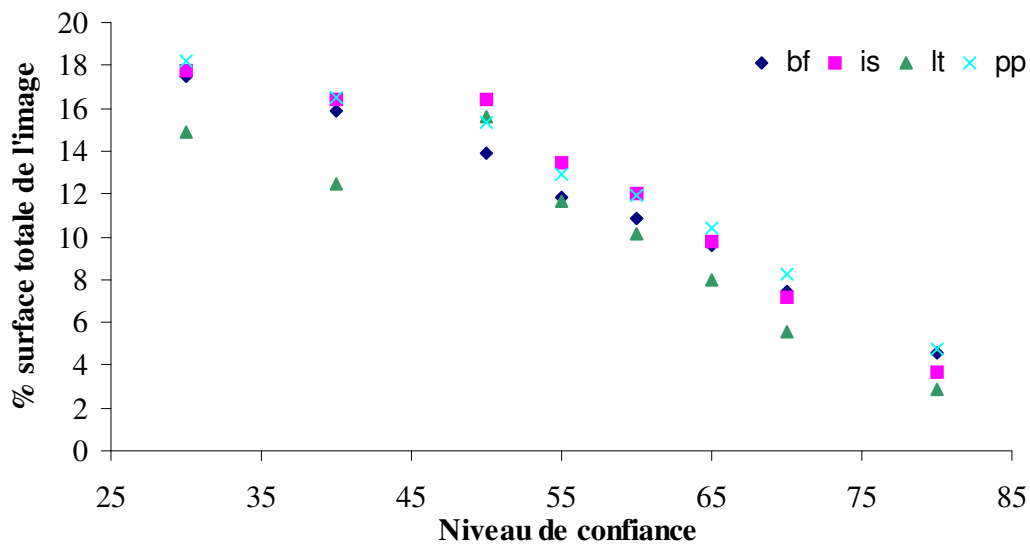


Figure D-7. Evolution de la surface de périnysium segmenté sur les coupes histologiques en fonction du niveau de confiance pour les différents types de muscles.

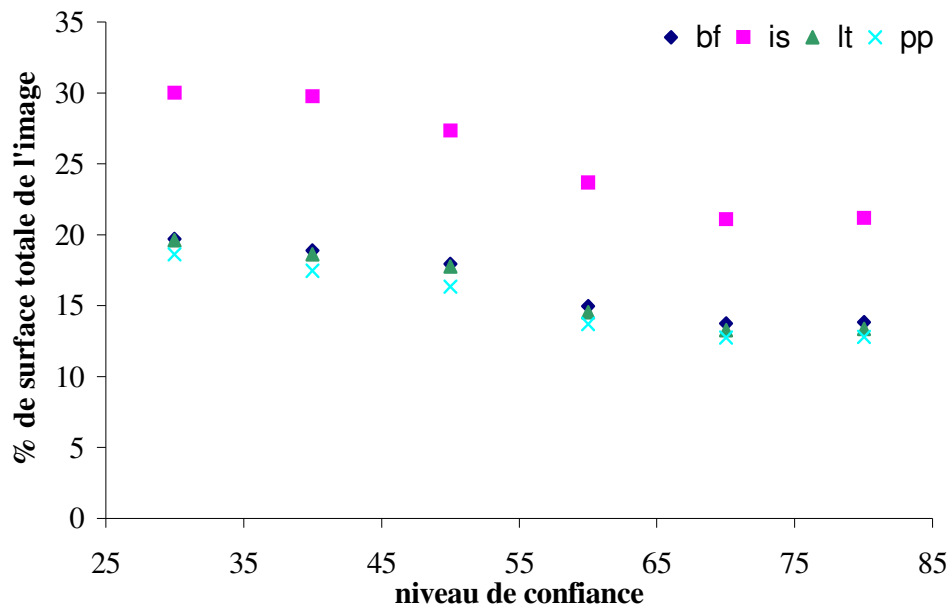


Figure D-8. Evolution de la surface de périnysium segmenté sur les images RMN en fonction du niveau de confiance pour les différents types de muscles.

D.3.3 Choix des images en RMN

La surface de périnysium segmenté par la méthode PMT à un niveau de confiance donné, évolue en fonction de la position de la coupe le long de l'épaisseur de l'échantillon. Elle est relativement stable au centre de l'échantillon (entre 10 et 35 mm). En revanche, une forte dérive est observée aux bords de l'échantillon (Figure D-9). Cette dérive s'explique par la plus forte hétérogénéité de l'image aux bords des échantillons en raison des artefacts de susceptibilité dus à la transition air/muscle.

Il est, de ce fait, recommandé d'éliminer les images aux bords pour le calcul de la surface moyenne du réseau conjonctif caractéristique d'un échantillon.

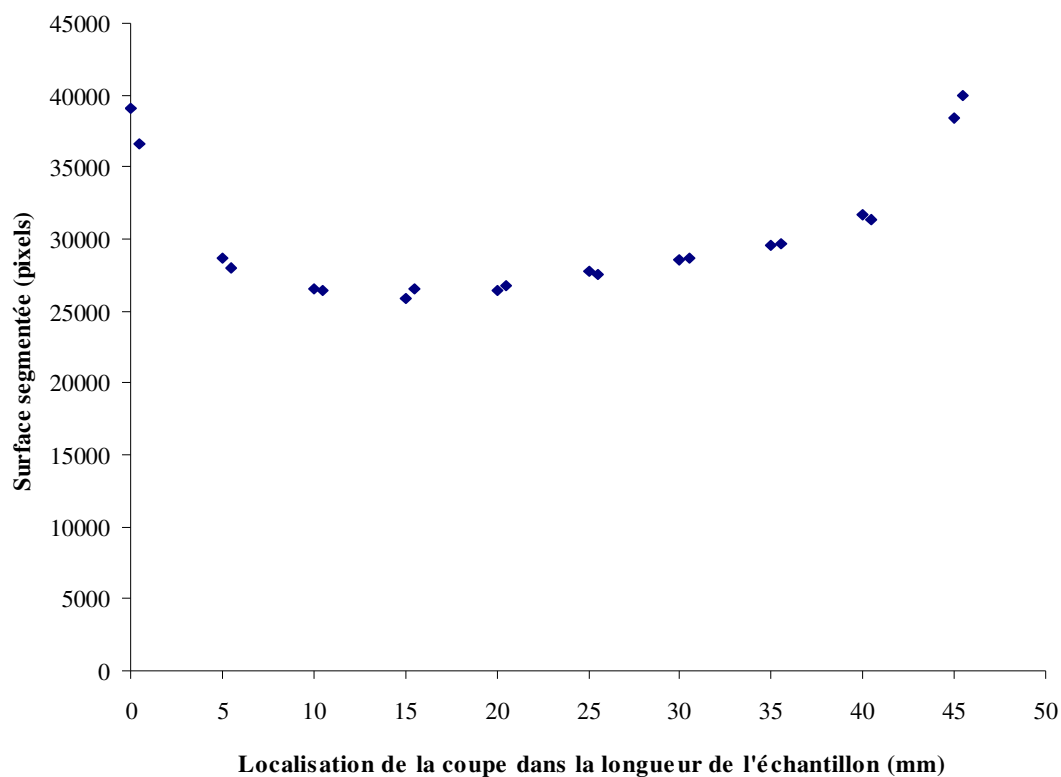


Figure D-9. Mesure de la surface de réseau segmenté par la méthode PMT à 80% en fonction de la localisation de la coupe virtuelle le long de l'échantillon de muscle en IRM.

D.4 DISCUSSION SUR LA METHODE PMT

D.4.1 Voies d'amélioration possibles de la méthode

Notre méthode de seuillage pourrait être améliorée à plusieurs niveaux, de la construction des cartes de référence à la mise au point des règles de seuillage.

Le réseau fin est caractérisé par une faible valeur de probabilité sur les cartes de référence. Ceci est principalement dû à la constitution probabiliste des cartes. La probabilité

de faire une erreur sur un segment fin est plus grande que sur un segment épais, à cause principalement de l'imprécision du tracé (irrégularité du trait, erreur de pointage). L'imprécision du tracé a donc un fort impact sur les segments les plus fins.

Plusieurs possibilités existent pour améliorer la qualité des cartes de référence. Tout d'abord, comme les juges ne sont pas entraînés, leurs tracés sont assez dispersés. L'entraînement pourrait améliorer le consensus. De plus les cartes de référence peuvent être améliorées en pondérant la moyenne des tracés par la performance des juges. De cette manière, les zones conflictuelles (présentant le plus de dispersion de tracés) pourraient être identifiées en calculant :

$$\Omega = \cup S_i - \cap S_i, \quad \text{Eq D-3.}$$

avec S_i le tracé du juge i .

Ainsi le tracé de chaque juge sera pondéré par :

$$w_i = |\Omega| / |S_i \cap \Omega| \quad \text{Eq D-4,}$$

inversement proportionnel à la participation du juge aux zones conflictuelles Ω . Par ailleurs, étant donné l'épaisseur faible du réseau dans ces zones (souvent un pixel), les petites erreurs de tracés pourraient être détectées et prises en compte en calculant un critère local de continuité.

Les zones de désaccord des juges sont principalement dues à un faible contraste. Ainsi un seuillage global de l'image dont les règles sont définies sans exclure les régions de désaccord entraîne des erreurs sur les régions consensuelles. La segmentation de nos images pourrait donc être améliorée en traitant séparément les deux types de régions de l'image. Les régions de désaccord pourraient être identifiées en calculant un critère de contraste, dont la valeur critique pourrait être déterminée à partir des cartes de référence. Ainsi chaque carte de référence donnerait deux seuils t_1^* pour les régions consensuelles et t_2^* pour les régions de désaccord, menant à deux règles de seuillage pour chaque niveau de confiance, définissant une forme simplifiée de seuillage local.

La détermination du seuil optimal t^* est basée sur la localisation du minimum de la courbe E . Ce minimum est généré par l'évolution opposée de E_{oo} et E_{ob} . La forme de la courbe E varie en fonction de ε . Suivant l'évolution des pentes de E_{oo} et E_{ob} , E forme une zone autour du minimum global devenant de plus en plus large avec l'augmentation de ε . Ainsi l'erreur sur t^* augmente, impliquant une erreur plus importante sur la règle de seuillage pour ε élevé. Pour améliorer cette étape, t^* pourrait être déterminé en tenant compte de la largeur du plateau formé par E . Par exemple, t^* pourrait être choisi comme le milieu de ce

plateau, plutôt que comme le minimum global de E qui est très sensible au bruit. En outre, le critère E a été empiriquement établi comme le compromis équilibré entre E_{oo} et E_{ob} . Il serait possible d'augmenter l'impact d'une de ces erreurs en pondérant les termes de la somme E . Ainsi la forme de la courbe de E devrait être modifiée. Par ailleurs, d'autres méthodes permettraient de déterminer la valeur de t^* , comme par exemple les courbes de ROC (Receiver Operating Characteristic), qui permettent de trouver le meilleur compromis entre spécificité et sensibilité d'une méthode (Saber *et al.*, 1996). Par ailleurs, Van der Weken *et al.* ont montré que d'autres critères de comparaison étaient plus performants que les critères de similarité comme E_{oo} et E_{ob} . En effet, ils proposent des critères plus proches de l'évaluation visuelle.

Avec le seul a priori de linéarité, l'analyse statistique a imposé aux modèles conduisant aux règles de seuillage à être des combinaisons linéaires de seulement deux paramètres de l'histogramme de premier et second ordre. Pour notre jeu de données composé de $I_t = 10$ images, les règles de seuillage sont calculées principalement à partir de m et σ , ainsi la forme de l'histogramme a peu d'influence sur les règles de seuillage. En effet, les coefficients d'asymétrie et d'aplatissement n'apparaissent pas dans les modèles. Pour tenir compte des paramètres de la forme de l'histogramme dans les règles de seuillage, le nombre d'images tests pourrait être raisonnablement augmenté.

D.4.2 Avantages et inconvénients de la méthode

Le facteur limitant de la méthode PMT est la phase d'apprentissage nécessaire pour la mise au point des règles de seuillage, qui doit être renouvelée à chaque modification des conditions d'acquisition. Cependant quand les images sont obtenues en conditions standardisées, cette phase devient un investissement permettant la mise au point d'un outil de segmentation performant. En effet, la méthode a été testée avec succès sur des coupes de muscles, colorées dans les mêmes conditions, mais provenant d'une autre espèce animale (rat, Picc, 2005) Par ailleurs en tant que méthodologie générique, le seuillage PMT a été utilisé sur d'autres modalités d'imagerie comme l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). En effet, le jeu d'images tests issues de l'IRM a servi à construire des cartes de référence spécifique à cette modalité d'imagerie. Les règles de seuillage obtenues donnent des résultats aussi satisfaisants qu'en histologie.

Un avantage de la méthode PMT est de pouvoir quantifier l'erreur de segmentation. Ainsi cela donne accès à un moyen objectif pour mesurer l'efficacité d'une éventuelle étape de prétraitement par comparaison avec les cartes de référence en analysant les variations de

l'index de performance E. Par exemple, cette méthode est très sensible aux problèmes d'hétérogénéité du fond des images aux faibles niveaux de confiance. Une amélioration de l'homogénéité d'intensité des pixels du fond peut être effectuée *a posteriori* (Likar et Viergever, 2000). Elle a pour effet immédiat de faire diminuer la valeur de Eob et secondairement Eoo est également légèrement améliorée. Sur les images RMN, les variations extrinsèques d'homogénéité du fond ont pu être estimées par fermeture morphologique. Ensuite les images originales ont été divisées par l'image de ces variations. Pour $\varepsilon < 50\%$, des différences sur E, Eoo et Eob sont significatives ($p < 0,05$) entre la segmentation des images non corrigées et corrigées (Figure D-10).

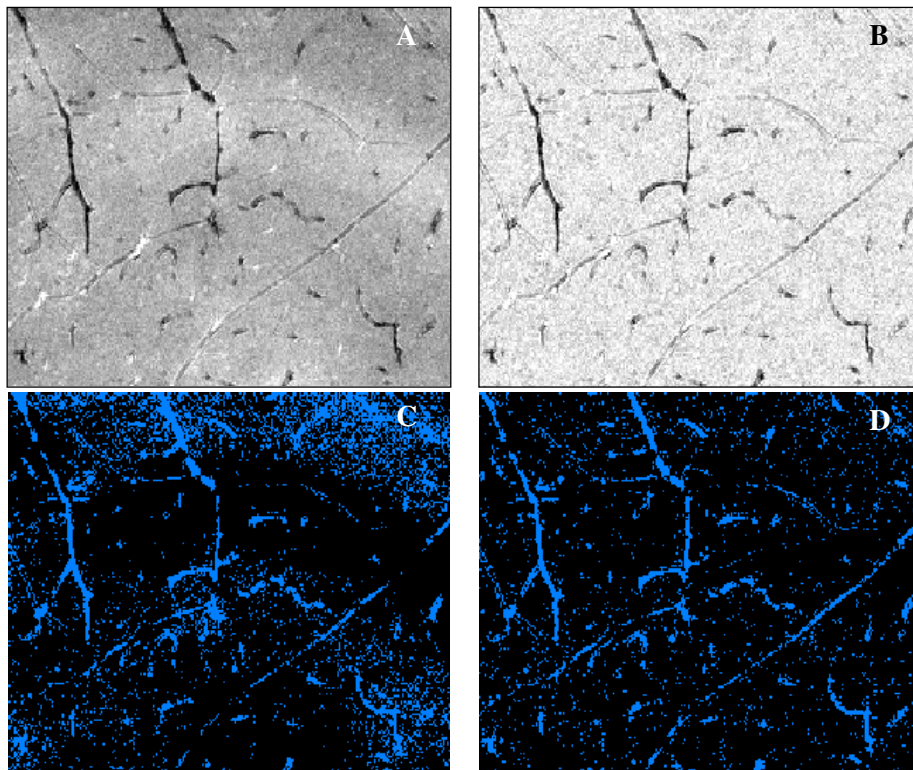


Figure D-10. Amélioration de l'image (A) après une correction du fond par fermeture morphologique sur les images RMN (B). La segmentation avant pré-traitement (C) est beaucoup plus bruitée qu'après pré-traitement (D).

Un autre avantage de la méthode PMT réside dans son paramétrage par le niveau de confiance ε , donnant un accès aux différents niveaux d'organisation du périnysium, et en particulier permettant la segmentation du réseau le plus fin. Ainsi le rôle de chaque niveau de périnysium sur le comportement mécanique de la viande peut être évalué.

D.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une méthode de segmentation adaptative a été développée et validée pour le seuillage global des images unimodales de réseau conjonctif intramusculaire. Elle fournit des variables objectives pour la caractérisation du tissu conjonctif et doit permettre d'apporter un éclairage nouveau sur les facteurs qui déterminent la tendreté de la viande. En effet, la segmentation du réseau conjonctif nous donne également la possibilité d'étudier la taille et la forme des faisceaux musculaires qu'il délimite.

La construction de cartes de référence est une méthode générique, qui peut être appliquée à tout type de modalité d'imagerie. De plus elle constitue un outil incontournable pour la validation et la comparaison de n'importe quelle méthode de segmentation.

Bien qu'à ce jour toutes les méthodes de segmentation utilisées sur des images de muscle aient été des approches « bottom-up », une approche « top-down » pourrait être envisagée si elle intègre les changements de direction et les ruptures du réseau conjonctif. Ainsi elle permettrait de segmenter en tant qu'objets à part entière les structures en faisceaux caractéristiques du tissu musculaire. Par exemple, la méthode de segmentation en régions homogènes développées par Galland (2003) s'appuie sur des critères basés sur la description de la distance minimale (MLD). Elle permettrait de séparer les faisceaux sans *a priori* morphologiques forts. En outre elle est particulièrement adaptée au cadre de l'imagerie multi-composantes comme le permet l'utilisation de différentes colorations d'un même échantillon en histologie ou encore l'utilisation combinée de plusieurs modalités d'imagerie.

Par ailleurs, l'information apportée par la troisième dimension de l'espace a été très peu utilisée lors de la segmentation. Or le réseau de périmysium est relativement stable, selon les muscles, dans l'axe des fibres musculaires. Ainsi l'information apportée par des coupes sériées est donc complémentaire. Elle permettrait la reconstruction du réseau de périmysium qui apparaît jusqu'à présent fractionné.

E. ORGANISATION SPATIALE DU PERIMYSIUM ET TEXTURE DE LA VIANDE CUITE

Les deux chapitres précédents ont permis de mettre au point et valider les méthodes (chap. C et D) et le plan d'expérience (chap. C) à réaliser pour l'étude de la relation entre la texture de la viande cuite et les caractéristiques du tissu conjonctif, qui a fait l'objet de ce troisième chapitre. Celui-ci comporte trois volets.

Un premier volet aborde l'évaluation de la texture de la viande. Il comprend le contrôle de l'état de maturation et de contraction des muscles, afin de s'assurer que la variabilité de la résistance mécanique des fibres musculaires a une influence mineure sur la variabilité de la texture induite par le type de muscle. L'évaluation de la texture de la viande est ensuite effectuée de manière instrumentale par compression, puis sensorielle à l'aide d'un profil de texture réalisé par un jury entraîné.

Le deuxième volet porte sur la caractérisation du tissu conjonctif périmysial ; il comprend la détermination de la concentration en collagène, de sa stabilité thermique et de l'organisation spatiale. Celle-ci a été analysée à l'aide de deux modalités d'imagerie, l'histologie et l'IRM, et grâce à la méthode de segmentation décrite dans le chapitre **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Enfin le troisième volet concerne la mise en relation de ces deux groupes de données dans le but de déterminer et de comprendre l'influence du tissu conjonctif sur la texture de la viande cuite.

E.1 MESURES DE TEXTURE

E.1.1 Contrôle des échantillons

Comme le montre les valeurs de la contrainte à 20% de déformation mesurée sur des éprouvettes de viande crue (Tableau E-1), la viande était très maturée ($C_{20} < 5 \text{ N/cm}^2$) et aucune différence significative entre animaux n'était observée ($p > 0,05$). L'incidence de la résistance myofibrillaire sur la variabilité de la texture de la viande pouvait donc être considérée comme minimale.

La gamme des longueurs moyennes de sarcomère (1,9 et 2,7 μm) était comparable à celles trouvées dans la littérature pour les types de muscle correspondants dans un état de contraction normal (Tableau C-3), attestant de ce fait l'absence du phénomène de contracture

au froid. Les valeurs obtenues pour les muscles BF et LT sont comparables à celles de l'étude préliminaire (Tableau C-2). Les muscles IS et PP ont obtenu en revanche des valeurs supérieures dans ce jeu de données. Les variations de la dureté qui ont été mesurées sur viande cuite ont donc été essentiellement le résultat des variations dans les caractéristiques du tissu conjonctif.

Tableau E-1. Valeurs moyennes et écarts-types de la contrainte à 20% de déformation mesurée sur viande crue et de la longueur des sarcomères des quatre types de muscles. Des lettres différentes dans une colonne indiquent une différence significative entre les moyennes pour $p < 0,05$.

Compression à 20% de déformation sur viande crue (N / cm ²)	Longueur de sarcomère (µm)
PP (4,1 ± 1,3) <i>a</i>	PP (2,7 ± 0,5) <i>a</i>
IS (3,9 ± 1,5) <i>a</i>	BF (2,0 ± 0,2) <i>b</i>
BF (2,9 ± 0,9) <i>ab</i>	IS (2,4 ± 0,3) <i>ab</i>
LT (2,4 ± 0,7) <i>b</i>	LT (1,9 ± 0,4) <i>b</i>

E.1.2 Compression à 80% de déformation

Les valeurs des contraintes de compression déterminées sur la viande crue variaient dans la gamme 39 – 102 N/cm². Le muscle PP présentait la contrainte la plus élevée et le muscle LT la plus faible. Les muscles BF et IS étaient intermédiaires (Tableau E-2). Les muscles se sont classés selon le même ordre que lors de l'étude préliminaire, tout en présentant des valeurs globalement plus élevées pour les muscles IS, LT et PP d'environ 20%, malgré une durée de maturation plus longue. Cet écart peut s'expliquer par la différence de race (Charolais versus Aubrac) (Dransfield *et al.*, 2003) et d'âge entre les deux groupes de vaches de réforme étudiés (35-81 mois versus 17-27 mois dans l'étude préliminaire). Les valeurs pour le muscle LT sont cependant toujours comprises dans les gammes publiées pour des muscles à 21 jours *post mortem* par Sanudo *et al.* (2004) (29 à 43 N/cm²) en faisant varier la race et le poids à l'abattage et par Monson *et al.* (2004) (28 à 50 N/cm²) pour différentes races bovines.

Tableau E-2. Valeurs moyennes et écarts-types de la contrainte à 80% de déformation sur viande crue et cuite des quatre types de muscles bovins. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).

Contrainte sur viande crue (N / cm ²)	Contrainte sur viande cuite (N / cm ²)
PP (102,2 ± 29,1) a	PP (174,2 ± 37.6) a
BF (85,0 ± 15,7) ab	BF (126,6 ± 37.2) b
IS (67,1 ± 29,3) bc	LT (97,8 ± 10.8) c
LT (39,1 ± 12,7) c	IS (85,1 ± 13.5) c

La cuisson de la viande dans les conditions utilisées (30 min à 65°C) a eu pour conséquence un accroissement sensible de la contrainte à 80% de déformation. Cet accroissement, de 40 à 50% pour les muscles PP, BF et IS, a atteint la valeur de 120 % dans le cas du muscle LT potentiellement le plus tendre. Les contraintes ont ainsi varié dans la gamme 85 - 174 N/cm² (Tableau E-2), et étaient en accord avec celles publiées par Kamoun et Culioli (1989) dans le cas de muscles de bovins cuits à 55°C pendant 30 min. Ces auteurs ont rapporté une contrainte maximale en configuration longitudinale de 54 et 161 N/cm² à un taux de compression de 80% pour les muscles LT et PP, respectivement. Bien qu'ils aient effectué un test en compression sinusoïdale, nos résultats sont comparables car ces auteurs ont montré que la fréquence de compression n'influait pas sensiblement la valeur de la contrainte maximale atteinte. Par ailleurs, Bouton *et al.* (1975) ont rapporté des valeurs de contrainte, sur viande cuite à 90°C pendant 90 min, allant de 40 (pour le muscle *Psoas major* (PM)) à 85 N/cm² pour le muscle PP. Ces valeurs sont plus faibles que les nôtres. Toutefois, ces auteurs n'ont pas réalisé réellement un test de compression mais plutôt un test se rapprochant des mesures en pénétrométrie, avec un outil cylindrique de diamètre très inférieur à la surface des échantillons analysés.

L'analyse de variance montre un effet significatif du type de muscle ($p < 0,05$), contrairement au test de cisaillement qui ne les distinguait pas dans l'étude préliminaire (chap. C.3.2). Ainsi, trois groupes ont pu être distingués significativement ($p < 0,05$), avec le muscle PP le plus résistant, le muscle BF intermédiaire et les muscles IS et LT les moins résistants. Ces résultats confirment les observations de Harris et Shorthose (1988), Shackelford *et al.* (1995) ou plus récemment Rhee *et al.* (2004). Il est à noter que les muscles sont plus facilement différenciés après qu'avant cuisson, ce qui témoigne de l'importance des

modifications induites par le traitement thermique dans le déterminisme de la texture de la viande.

Par la suite, nous avons cherché à modéliser la texture de la viande cuite par des variables, en très grand nombre, caractérisant le tissu conjonctif. Compte tenu que les valeurs déterminées de C80 sur viande cuite ne présentaient pas de différence significative entre animaux ($p > 0,05$), les 32 échantillons ont pu être considérés comme indépendants et non comme huit échantillons (correspondant au nombre d'animaux) comportant quatre répétitions (correspondant au nombre de types de muscle). Ainsi le déséquilibre entre nombre d'observations et nombre de variables prédictives est acceptable pour pouvoir réaliser les analyses statistiques nécessaires comme l'analyse factorielle et la régression linéaire.

E.1.3 Evaluation sensorielle

E.1.3.1 Profil de texture

Les juges ont participé à trois séances d'entraînement résumées dans le Tableau E-3. La première séance a permis de générer le vocabulaire caractéristique des échantillons. Lors de cette séance, les juges ont proposé un grand nombre de qualificatifs ($n = 27$). Certains étaient redondants et ont été regroupés sous un même descripteur. Ainsi les termes « tendre », « mou », « dur » et « ferme » ont été regroupés sous le descripteur « tendre ».

Ensuite lors de la deuxième séance, les douze descripteurs retenus ont été classés par ordre d'occurrence et proposés au jury lors de la deuxième séance (Tableau E-3). Cette séance a servi à valider le pouvoir discriminant des termes pour les échantillons à tester. Ainsi les descripteurs « homogène » et « granuleux » ont été supprimés de la liste des descripteurs du profil car ils ne distinguaient pas significativement ($p > 0,05$) les quatre types de muscle de l'étude. Cette séance a également permis d'identifier l'effet « dégustateur » pour chacun des descripteurs. En effet, certains descripteurs comme « juteux », « fondant », « granuleux », « collant » ou encore « élastique » ont présenté des différences significatives entre les juges ($p < 0,05$). Ceci a pu être lié à un problème de variabilité intra-échantillon. Ainsi deux juges notant le même échantillon ont pu déguster des morceaux en fait très différents, ce qui a pu entraîner une différence dans leur note liée à l'échantillon et non à leur façon de noter. Par ailleurs, un effet « juge » significatif a pu également traduire un problème de calibration de l'échelle de notation, d'où le besoin d'une troisième séance d'entraînement.

La troisième séance a permis aux juges de bien maîtriser la cotation de chaque descripteur et de corriger les dérives observées sur certains descripteurs lors de la séance

précédente. Au terme de cette séance, trois termes supplémentaires ont été éliminés (« fondant », « râpeux » et « élastique »). Le descripteur « râpeux » n'était plus discriminant du type de muscle ($p > 0,05$). Le descripteur « fondant » faisait toujours apparaître un effet « juge ». De plus ces deux termes ne semblaient pas très appropriés pour décrire un produit tel que de la viande cuite. Le descripteur « élastique » présentait un effet « juge » significatif ($p < 0,05$) et ne permettait pas de discerner les types de muscle ($p > 0,05$). Il a donc été écarté du profil de texture pour cette étude.

Tableau E-3. Evolution, au fil des séances d'entraînement, de la liste des descripteurs du profil sensoriel de dégustation de viande bovine cuite sous vide, 30 min à 65°C au bain-marie.

<div> <div>Éliminé après la 2^{ème} séance</div> <div>Éliminé après la 3^{ème} séance</div> </div>	
Descripteurs générés lors de la première séance	Conservés lors de la seconde séance
Tendre – Mou – Ferme – Dur	Tendre
Compact – Dilacéré – Fibreux – S'émiette	Compact
Juteux – Humide – Sec	Juteux
Résidu – Nerveux	Résidu
Léger – Mousseux – Souple	Souple
Fondant – Onctueux	Fondant
Finesse du grain – Granuleux	Granuleux
Film sur le palais – Collant	Collant
Homogène	Homogène
S'écrase – Pâteux – Farineux	Farineux
Elastique	Elastique
Râpeux	Râpeux

Tableau E-4. Valeurs moyennes des descripteurs sensoriels du profil de texture des quatre types de muscles bovins cuits 30 min à 65°C par un jury de dix dégustateurs entraînés sur une échelle de 1 à 10. Des lettres différentes signifient une différence significative entre les moyennes ($p < 0,05$).

	Tendre	Compact	Juteux	Résidu	Souple	Collant	Farineux
BF	4,1 b	3,9 a	3,7 c	4,1 a	3,0 b	2,3 b	2,2 a
IS	5,7 a	3,0 b	4,5 a	2,2 b	4,1 a	3,4 a	1,3 b

LT	6,1 a	2,6 b	3,4 c	1,9 b	4,2 a	3,5 a	2,4 a
PP	4,1 b	3,9 a	4,3 ab	3,6 a	2,9 b	2,2 b	1,5 b

Le jury de dégustation a classé les muscles en deux groupes pour la plupart des descripteurs sensoriels (Tableau E-4). Pour la majorité des descripteurs, les muscles BF et PP s'opposent aux muscles IS et LT. Le découpage était différent pour la jutosité, puisque le BF et le LT formaient un groupe de muscles peu juteux. Ils apparaissaient également comme les muscles les plus farineux. Une ANOVA à trois voies (muscle, animal, sujet) a permis de montrer que l'effet « muscle » était également robuste pour tous les descripteurs, même lorsqu'il était testé sur l'interaction « sujet × muscle ».

Les valeurs de tendreté étaient en accord avec celles présentées par d'autres études ((Mc Keith *et al.*, 1985 ; Jeremiah *et al.*, 2003b ; Carmack *et al.*, 1995 ; Rhee *et al.*, 2004) (Tableau E-5). En terme de résidu, la hiérarchie entre les 4 muscles était respectée, le LT présentait le moins de résidu et le PP le plus. La grande jutosité du muscle IS a confirmé les observations de Mc Keith *et al.* (1985), Carmack *et al.* (1995), et Rhee *et al.* (2004).

Tableau E-5. Revue bibliographique de trois descripteurs sensoriels (tendreté globale, teneur en résidus en bouche et jutosité) sur quatre types de muscles de bovins. Les valeurs présentées ont été recalculées pour correspondre à notre échelle de notation comprise entre 0 et 10.

		Tendreté globale	Résidu	Jutosité
Carmack <i>et al.</i> , 1995	BF	4,9	/	4,7
	IS	7,2	/	6,6
	LT	6,9	/	5,2
	PP	3,8	/	5,1
Rhee <i>et al.</i> , 2004	BF	3,7	4,6	5,3
	IS	5,9	6,7	5,3
	LT	5,7	6,9	5,1
Jeremiah <i>et al.</i> , 2003b	BF	5,9	5,9	6,0
	IS	6,1	6,1	5,9
	LT	6,6	6,9	5,5
	PP	3,5	4,1	5,6
McKeith <i>et al.</i> , 1985	BF	5,44	4,91	6,18
	IS	6,50	6,23	6,43
	LT	6,42	6,74	5,82
	PP	4,57	4,02	5,27

L'analyse en composantes principales réalisée sur les valeurs des variables sensorielles a montré que les deux premières composantes principales expliquent près de 84% de la

variabilité entre les individus, et le premier axe (F1) en explique près de 60% à lui seul (Figure E-1A). Cet axe est fortement expliqué par le descripteur « tendre » (Figure E-1B). Le second axe (F2) (24% de la variance) est relié aux descripteurs « juteux » et « farineux » (Figure E-1B). Cette décomposition de la texture par ces trois descripteurs a déjà été décrite par Harries *et al.* (1972). Les muscles IS et LT forment des nuages de points relativement disjoints, alors que les muscles BF et PP se recouvrent largement (Figure E-1A).

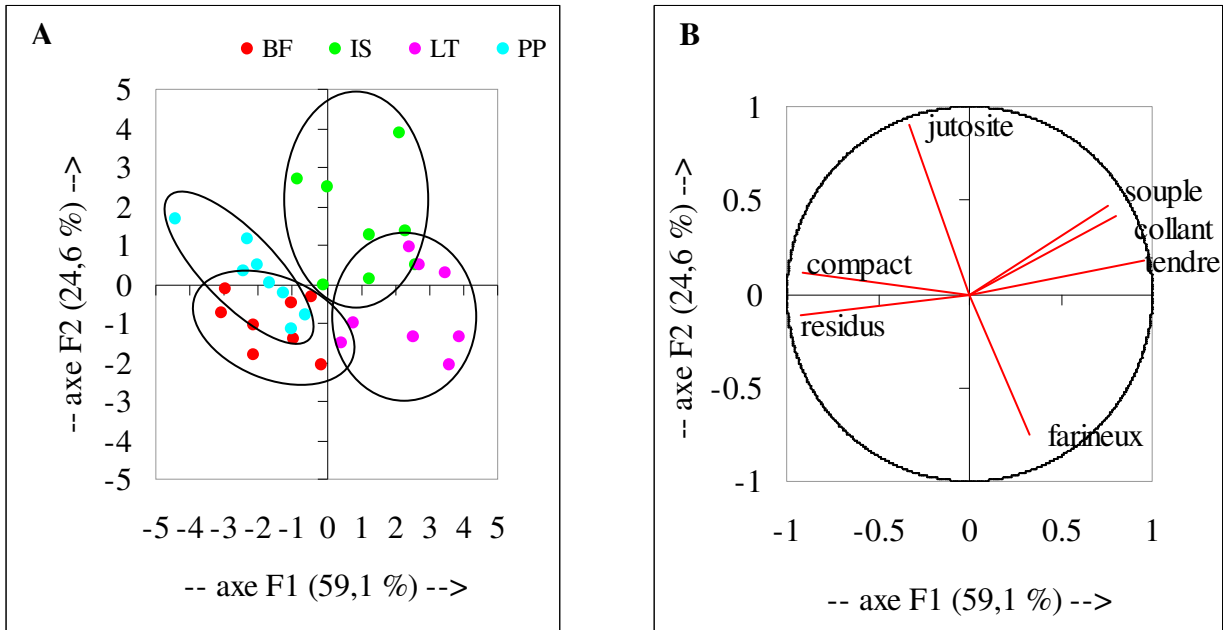


Figure E-1. Analyse en composantes principales des descripteurs du profil sensoriel de texture pour les quatre types de muscles bovins (*Biceps femoris* (BF), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT) et *Pectoralis profundus* (PP), dans le plan des deux premières composantes principales (F1 et F2). Représentation des observations (A) et des variables (B).

E.1.3.2 Note d'acceptabilité

En complément des notes évaluant les divers descripteurs de texture, le jury de dégustateurs a classé chaque échantillon parmi trois classes :

- 1 pour une texture désagréable
- 2 pour une texture moyenne
- 3 pour une texture agréable.

Il apparaît que les juges ont attribué une texture plus agréable aux muscles BF et PP et une moins bonne texture aux muscles IS et LT. Ceci est en opposition avec les mesures de tendreté qui ont classé BF et PP parmi les muscles durs et IS et LT parmi les muscles tendres. Cependant, tous les échantillons avaient mûré 21 jours, entraînant un attendrissement extrême des morceaux. Les muscles IS et LT ont été, de ce fait, probablement perçus comme trop tendres, et même « mous », ce qui a pu alors devenir un critère de moindre acceptabilité.

E.1.3.3 Relation entre les mesures instrumentales et sensorielles

Les seules variables instrumentales significativement corrélées avec les descripteurs sensoriels du profil généré par les dégustateurs sont les variables C80cuit et E80cuit (Figure E-2). La contrainte à 80% de déformation est, ainsi, le paramètre décrivant le mieux les descripteurs sensoriels en étant corrélé négativement à la tendreté des échantillons ($R = -0,64$).

Ce coefficient de corrélation est relativement plus élevé que celui de Bouton *et al.* (1975) ($R = -0,48$ contre $-0,64$) avec six types de muscle bovins cuits à 90°C pendant 90 min. Il est probable que les conditions de cuisson utilisées par ces auteurs aient très sensiblement atténué les différences entre muscles et donc la gamme de variation de tendreté. Le coefficient de corrélation est, en revanche, beaucoup plus faible que celui obtenu par Mathonière *et al.* (2000) ($-0,64$ contre $-0,91$), avec des muscles *Semitendinosus* et *Semimenbranosus* de bovins cuits à 60°C et 80°C pendant 30 min.

Cependant, ces auteurs avaient introduit, en plus du type de muscle, des sources de variation de la tendreté supplémentaires comme la durée de maturation, la température de cuisson et l'état de contraction du muscle, ce qui a conduit à une gamme de valeurs de compression nettement plus large (143 à 451 N/cm^2 contre 85 à 174 N/cm^2 pour notre étude). Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'élimination dans le jeu de données de ces auteurs des muscles contractés au froid, conduit à une gamme de valeurs de contraintes et à un coefficient de corrélation ($R = -0,55$) du même ordre de grandeur que celui de notre étude

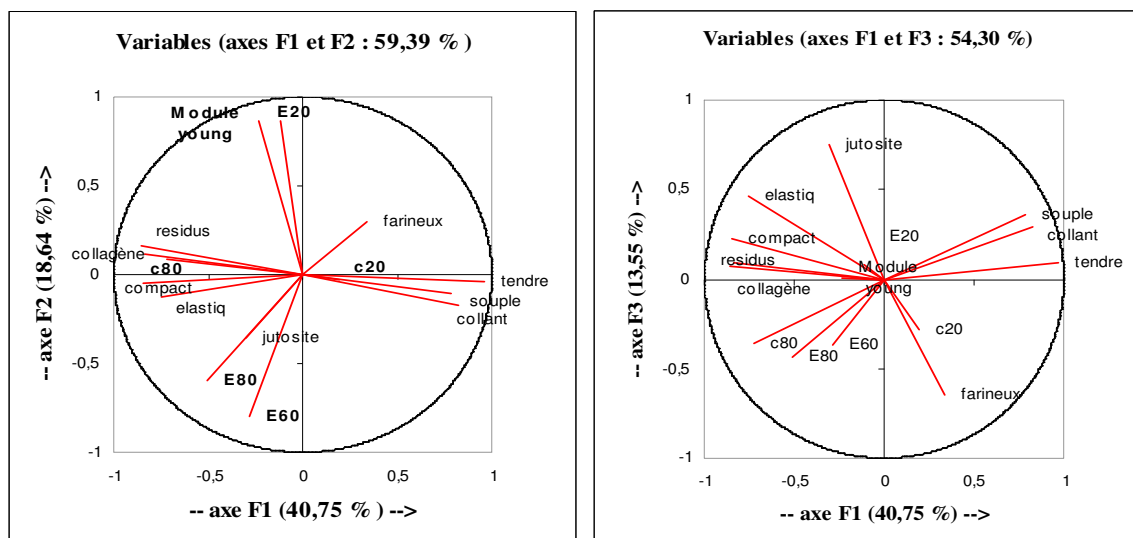


Figure E-2. Analyse en composantes principales des descripteurs sensoriels du profil de texture des quatre types de muscles bovins, évalués par un jury de dix dégustateurs entraînés et les mesures instrumentales effectuées sur les mêmes échantillons cuits dans les mêmes conditions pendant 30 min à 65°C .

E.2 RESEAU CONJONCTIF

E.2.1 Teneur en collagène

Les teneurs en collagène varient entre 0,56 et 1,21 mg d'hydroxyproline / g de tissu frais selon le muscle considéré (Tableau E-6). Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans l'étude préliminaire, sauf pour le muscle IS présentant une quantité de collagène un peu plus élevée (0,89 contre 0,74). Elles sont proches de celles publiées par Dransfield (1977) et Torrecano *et al.* (2003). En revanche, notre valeur pour le muscle IS est inférieure à celles présentées par Jeremiah *et al.* (2003a) et Mac Keith *et al.* (1985) (Tableau C-5). En effet, lors du broyage des échantillons, nous avons décidé d'éliminer la trame conjonctive qui traverse le muscle IS (chap. C.4.1).

Les teneurs en collagène présentent un coefficient de variation intra muscle au maximum de 11% ; elles sont significativement différentes ($p < 0,05$) pour les 4 muscles qui se classent dans le même ordre que pour les mesures mécaniques (PP>BF>IS>LT).

Tableau E-6. Dosage du collagène estimé par la quantité d'hydroxyproline sur les quatre types de muscle. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$)

	Teneur en hydroxyproline (mg / g de tissu frais)	
	Moyenne	Écart-type
PP	1,21 <i>a</i>	0,13
BF	1,09 <i>b</i>	0,12
IS	0,89 <i>c</i>	0,06
LT	0,56 <i>d</i>	0,05

E.2.2 Teneur en lipides

Les teneurs en gras prédites (Tableau E-7) sont en accord avec les valeurs couramment mesurées chez le bovin pour ces types de muscles (Jeremiah *et al.*, 2003a). Les types de muscles ne présentent pas de différence significative ($p < 0,05$). Ceci est dû à des écart-types élevés à cause d'une forte variabilité inter-animale. Cependant le muscle IS possède toujours les pourcentages de lipides les plus élevés, alors que le muscle PP apparaît comme le muscle le moins gras. Ceci est confirmé visuellement sur les images acquises à partir des coupes histologiques (Figure E-3) et des images RMN.

Tableau E-7. Pourcentage de lipides déterminé par spectroscopie infrarouge sur les quatre types de muscle. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$)

	Pourcentage de lipides (%)	
	Moyenne	Écart-type
IS	5,3 <i>a</i>	2,7
LT	4,3 <i>a</i>	2,3
BF	4,0 <i>a</i>	2,0
PP	3,6 <i>a</i>	1,9

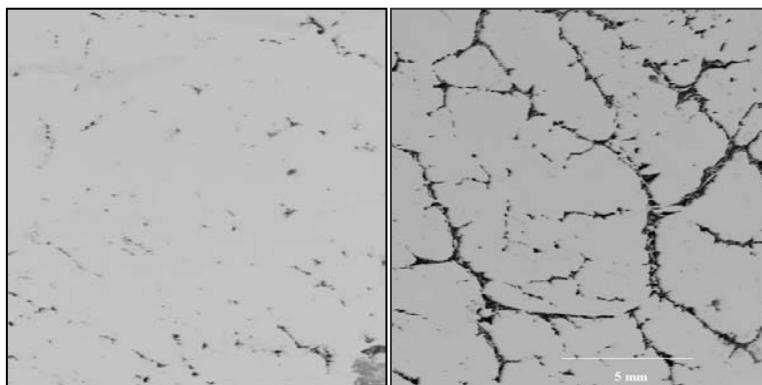


Figure E-3. Coupes histologiques des muscles PP (à gauche) et IS (à droite) colorées à l'huile rouge, mettant en évidence les lipides, ici en noir.

Une description plus détaillée de la localisation des lipides selon le type de muscle est présentée dans le chapitre F.

E.2.3 Stabilité thermique du collagène

Les conditions de cuisson (65°C pendant 30 min) n'ont permis de solubiliser qu'une très faible partie du collagène intramusculaire (2 à 5%), sans différence significative entre les types de muscle ($p > 0,05$) (Tableau E-8). Ces valeurs sont très inférieures à celles présentées par Torrescano *et al.* (2003) pour les mêmes types de muscle (17 à 26%). Cette différence peut aisément s'expliquer par le régime de chauffage beaucoup plus drastique utilisé par ces auteurs (90°C pendant 2h). Le fait que la solubilisation du collagène soit très limitée dans notre étude ne signifie pas que le collagène n'ait pas subi de dénaturation thermique et donc que sa résistance mécanique n'ait pas fortement évolué. Cependant les conséquences de cette dénaturation sur la solubilisation, ne sont pratiquement pas détectables avec la méthode utilisée.

Tableau E-8. Pourcentage de collagène solubilisé après une cuisson de 30 min à 65°C sur les quatre types de muscle Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

	Collagène soluble (%)	
	Moyenne	Écart-type
IS	5 <i>a</i>	9
PP	5 <i>a</i>	11
LT	4 <i>a</i>	12
BF	2 <i>a</i>	6

E.2.4 Paramètres d'organisation spatiale du périmysium

E.2.4.1 Mesures des caractéristiques du réseau

A partir des images acquises en histologie et en IRM, deux paramètres caractérisant le réseau de tissu conjonctif segmenté ont été mesurés : la surface et la longueur de la trame. Un troisième paramètre correspondant au rapport entre surface et longueur a été utilisé comme estimateur de l'épaisseur moyenne (chap. D.3.1) de tous les segments de l'image (Tableau E-9 à Tableau E-12).

Images de coupes histologiques

La coloration au Rouge Sirius utilisée pour les coupes histologiques permet l'identification du périmysium sans prise en compte des lipides. En utilisant cette méthode, pour le niveau de confiance $\varepsilon = 80\%$, trois groupes de muscles peuvent être différenciés à partir des mesures de surface (BF ; PP > IS > LT) ou de longueur de périmysium (PP ; IS > BF > LT) (Tableau E-9). Le muscle LT possède un réseau périmysial peu développé. En effet, il occupe une faible surface dans l'image (2,8%) et sa longueur de réseau, la plus faible, indique qu'il n'est pas très ramifié (1,4%). En outre le rapport S/L, homogène à une épaisseur moyenne, lui attribue la valeur la plus faible (56,5 μm). Le muscle IS occupe également une surface faible dans l'image (3,7%) mais la très grande longueur de son réseau (1,8%) est caractéristique d'un périmysium fin (56,7 μm) et très ramifié. Le périmysium du muscle PP couvre une large surface (4,7%) et une grande longueur (2,0%), synonyme d'un réseau à la fois épais (65,1 μm) et ramifié (Figure E-4). Le périmysium du muscle BF occupe une des surfaces les plus grandes (4,6%), équivalente à celle du PP mais sa longueur est inférieure à celle de ce dernier (1,6 et 2,0% respectivement). Ces deux muscles possèdent des quantités équivalentes de périmysium mais leurs structures diffèrent largement. Ainsi le muscle BF

possède donc, un réseau plus épais (78,4 μm) que le muscle PP mais avec un moindre degré de ramifications.

Précédemment Totland et al. (1988) ont proposé des valeurs comprises entre 5,2 et 6,4%, selon le type de muscle ; ce qui est plus proche de nos valeurs de surface pour $\varepsilon = 80\%$. Dans ce cas, les mesures ont été réalisées avec un grossissement plus faible et de ce fait, seules les trames les plus grossières du périmysium ont été prises en compte. En revanche, Geesink (1994) a proposé des surfaces de tissu conjonctif comprises entre 12,1 et 13,5%, selon le type de muscle. Ces valeurs sont proches de nos valeurs pour $\varepsilon = 40\%$. En effet, leurs mesures ont été effectuées sur des coupes à fort grossissement.

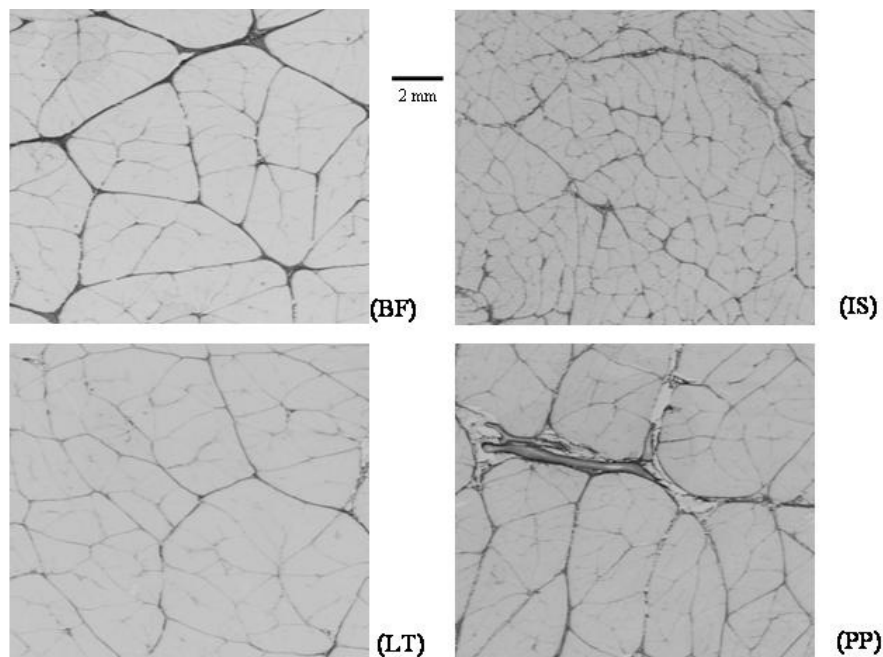


Figure E-4. Coupes histologiques transversales des quatre types de muscles colorées au Rouge Sirius. Les lignes noires représentent le périmysium alors que les myofibres apparaissent en gris.

Tableau E-9. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images de coupes histologiques par la méthode PMT pour le niveau de confiance $\varepsilon = 80\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

Surface (% image totale)	Longueur (% image totale)	Surface / Longueur (μm)
PP (4,7) a	PP (2,0) a	BF (78,4) a
BF (4,6) a	IS (1,8) ab	PP (65,1) b
IS (3,7) b	BF (1,6) b	IS (56,7) c
LT (2,8) c	LT (1,4) c	LT (56,5) c

Tableau E-10. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images de coupes histologiques par la méthode PMT pour le niveau de confiance $\varepsilon = 40\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

Surface (% image totale)	Longueur (% image totale)	Surface / Longueur (μm)
PP (16,5) a	IS (6,6) a	PP (79,2) a
IS (16,4) a	PP (5,7) b	BF (77,7) a
BF (15,9) a	BF (5,6) b	LT (71,7) b
LT (12,4) b	LT (4,8) c	IS (67,7) b

Pour un indice de confiance plus faible ($\varepsilon = 40\%$), les muscles présentent quasiment le même classement qu'à 80% (Tableau E-10), à l'exception du muscle IS. Alors que le réseau de celui-ci segmenté à 80% était peu important, il présente une surface très grande, pour un indice de confiance de 40% (16,4%), équivalente à celles des muscles PP et BF. De plus sa longueur est la plus élevée. Ceci est lié au fait que le périmysium du muscle IS est fin (67,7 μm) et n'est donc segmenté qu'à un faible niveau de confiance. Le réseau du muscle IS de plus très ramifié (Figure E-4) ; ce qui explique la valeur élevée de sa longueur à 40%. De plus, le rapport S/L augmente beaucoup plus entre 80 et 40% pour le muscle PP que pour le muscle BF. En effet ce muscle possède peu de trames fines segmentées quand le niveau de confiance ε diminue.

Les valeurs des épaisseurs du périmysium obtenues pour $\varepsilon = 40\%$ (comprises entre 67,7 et 79,2 μm), sont du même ordre de grandeur que celles précédemment publiées par Torrescano *et al.* (2001). Ces auteurs ont estimé l'épaisseur du périmysium primaire des muscles *Semitendinosus* et *Semimembranosus* de bovin à respectivement 111 et 121 μm et l'épaisseur de leur périmysium secondaire à environ 28 et 29 μm , soit une épaisseur moyenne de 70 et 75 μm . Nos valeurs à $\varepsilon = 80\%$, sensées représenter le périmysium primaire, sont tout de même assez basses par rapport à celles de Brooks et Savell (2004), qui ont estimé l'épaisseur du périmysium primaire du muscle LT à 80 μm et celle du muscle IS à 90 μm . Cependant nous classons, comme eux, ces deux muscles dans la catégorie des muscles possédant un périmysium fin.

Pour $\varepsilon = 40\%$, les valeurs de surface et de longueur sont supérieures à celles obtenues pour $\varepsilon = 80\%$. Ceci est cohérent avec le fait que le nombre de points segmentés augmente lorsque le niveau de confiance de la segmentation diminue. Le rapport S/L augmente avec la diminution du niveau de confiance, alors que l'apport de réseau segmenté fin devrait au contraire le faire diminuer. En effet, à un faible niveau de confiance, les trames fines

apparaissent et les trames épaisses qui n'avaient pas été complètement segmentées s'épaississent, entraînant une forte augmentation de la surface de réseau. En parallèle la longueur n'augmente pas dans les mêmes proportions puisque seule s'ajoute la longueur des trames fines qui apparaissent. Comme la surface augmente plus vite que la longueur, le rapport des deux augmente. Ce paramètre ne peut donc être considéré comme une mesure fiable de l'épaisseur moyenne du réseau. Par ailleurs le niveau de segmentation à 80% permet de mieux distinguer les types de muscle que celui à 40% pour lequel la variabilité entre muscles diminue.

Images RMN

L'IRM permet de détecter à la fois le tissu conjonctif riche en élastine (chap. F) et le tissu adipeux. Ainsi le signal visualisé est légèrement différent de celui obtenu sur des coupes histologiques où seul le collagène est coloré.

Pour $\varepsilon = 80\%$, les muscles sont divisés en deux groupes selon leur surface (IS > BF ; LT ; PP) et leur longueur (BF ; IS ; PP > LT) (Tableau E-12). Le périmysium du muscle BF couvre une surface de taille intermédiaire (12,8%) mais il est le plus long avec 4,7% de la surface totale de l'image. A cette échelle, le BF est le seul muscle dont les faisceaux de fibres musculaires sont bien définis (Figure E-5) et donc facilement segmentés en raison, probablement, de sa concentration en élastine (chap. F.3).

Le réseau du muscle IS occupe la plus grande surface (20,0%), constituée principalement de l'épais feuillet qui traverse le muscle ; il présente également la plus grande longueur de réseau (4,5%) ce qui confirme son degré élevé de ramification (Figure E-5). En IRM, la lame épimysiale de l'IS n'a pas été enlevée pour conserver l'intégrité du muscle ; la surface de réseau pour ce muscle a donc été surestimée en IRM. Cependant sa présence n'a pas entraînée de biais dans le calcul de la granulométrie des images de ce muscle.

Le périmysium du muscle LT couvre une faible surface (12,4%) et possède la plus courte longueur (4,0%). Le réseau de ce muscle apparaît donc comme également peu développé à cette échelle d'observation. En effet, une grande proportion des segments constituant le réseau du muscle LT sont trop fins pour être segmentés parce qu'ils occupent un volume trop faible dans un voxel pour générer un hyposignal contrastant avec les myofibres.

Cependant la surface de réseau du muscle LT est supérieure à celle du muscle PP, certainement à cause du persillé plus développé dans le muscle LT. Ainsi le muscle PP présente la plus faible surface de périmysium et une longueur faible. Malgré son périmysium épais, au vu des coupes histologiques (Figure E-4), peu de réseau est détecté mettant en

évidence les dépôts de lipides essentiellement localisés aux noeuds entre les faisceaux de fibres (Figure E-5). La question des différences entre les muscles par rapport à l'imagerie RMN est abordée dans le chapitre F.3.

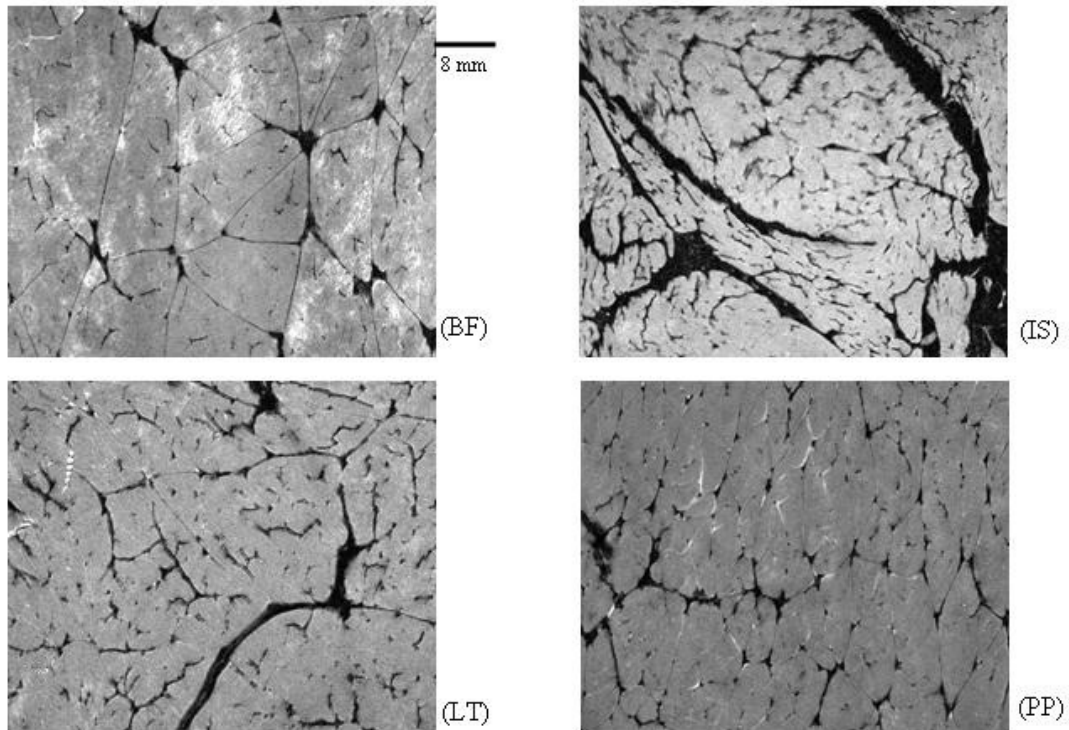


Figure E-5. Coupes transversales de quatre types de muscles bovins en IRM. Les lignes noires représentent le tissu conjonctif comprenant périnysium et lipides et les myofibres apparaissent en gris. Les taches blanches représentent l'eau libre.

Tableau E-11. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images RMN par la méthode PMT avec $\varepsilon = 80\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

Surface (% image totale)	Longueur (% image totale)	Surface / Longueur (μm)
IS (20,0) a	BF (4,7) a	IS (444) a
BF (12,8) b	IS (4,5) ab	LT (310) b
LT (12,4) bc	PP (4,3) b	BF (263) c
PP (11,3) c	LT (4,0) c	PP (257) c

Tableau E-12. Paramètres caractérisant la distribution du TCIM, déterminés après segmentation des images IRM par la méthode PMT, avec $\varepsilon = 40\%$. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$).

Surface (% image totale)	Longueur (% image totale)	Surface / Longueur (μm)
IS (28,0) a	BF (6,7) a	IS (435) a
LT (17,2) b	IS (6,4) ab	LT (290) b
BF (17,1) b	PP (6,2) ab	BF (250) c
PP (15,4) b	LT (5, 9) b	PP (242) c

A $\varepsilon = 40\%$, la surface du réseau segmenté augmente mais le classement des muscles reste le même qu'à 80% pour les deux mesures (Tableau E-12). La longueur du réseau augmente également pour tous les types de muscle et les différences entre les muscles s'amenuisent.

Le rapport S/L est compris entre 257 et 444 μm pour $\varepsilon = 80\%$ et 242 et 435 μm pour $\varepsilon = 40\%$ pour respectivement le LT et le PP, ce qui paraît élevé comparé aux données rapportées dans la littérature (Torrescano *et al.*, 2001 ; Brooks et Savell, 2004). Cependant ces auteurs ont travaillé avec des coupes histologiques imposant un champ d'imagerie plus restreint que celui utilisé en IRM dans le présent travail ; ils ont donc certainement mesuré l'épaisseur du périmysium d'ordre inférieur de fait moins épais. En diminuant le niveau de confiance le rapport S/L diminue, figurant la segmentation de trames plus fines. Pour cette modalité d'imagerie, la segmentation est quasiment complète à $\varepsilon = 80\%$. Les quelques pixels ajoutés quand ε passe de 80 à 40% concerne uniquement les trames fines, ne biaisant pas ainsi le comportement de l'estimateur de l'épaisseur.

Cependant la surface mesurée en histologie est quatre fois inférieure à celle mesurée en IRM. Le contraste basé sur la susceptibilité magnétique permet de détecter une petite insertion de susceptibilité différente dans une matrice, même si la taille de cette insertion est plus faible que le volume du voxel (Yablonskiy et Haacke, 1994). De ce fait il résulte un épaississement de l'objet détecté qui occupe le voxel entier même si sa taille réelle est inférieure. Ce phénomène s'amplifie avec le champ magnétique et le temps d'écho. De plus l'IRM, détectant aussi les lipides (gras intramusculaire), ne produit pas un signal spécifique du collagène. En effet, les lipides génèrent un fort hypo-signal, tendant à augmenter encore la surestimation du périmysium, alors que leur contribution aux variations de la texture de la viande est négligeable dans la gamme de teneur en gras considérée. La combinaison de ces

deux phénomènes explique les erreurs attachées aux mesures de surface et longueur du pérимysium en IRM et la différence de quantification du réseau entre les deux modalités d'imagerie.

E.2.4.2 Relation entre la surface du réseau et la composition du muscle

Le Tableau E-13 montre que la surface de réseau segmenté sur les images des coupes histologiques est bien reliée à la quantité de collagène intramusculaire et non à la teneur en lipides. En effet, le Rouge Sirius, colorant utilisé pour révéler le pérимysium sur les coupes histologiques ne se fixe pas sur les lipides (Figure E-4). En revanche la surface du réseau segmentée en IRM est reliée au pourcentage de gras et non à la quantité de collagène (Figure E-3).

Tableau E-13. Coefficients de détermination (R^2) entre les variables de composition du muscle (collagène, lipides) et la surface de réseau segmenté pour ε égal à 40 et 80% (ns signifie non significatif ; $p > 0,05$).

$\varepsilon =$	HISTOLOGIE		IRM	
	40%	80%	40%	80%
Collagène	0,37	0,48	ns	ns
Lipides	ns	ns	0,39	0,49
Collagène + lipides	0,39	0,58	0,39	0,49

E.2.4.3 Courbes granulométriques

Les courbes granulométriques permettent d'estimer la distribution des tailles des faisceaux de fibres musculaires, délimités par le pérимysium. Elles représentent la surface totale occupée par des éléments structurants hexagonaux de rayon croissant par pas de 1 pixel. Sur les images histologiques, les courbes granulométriques décrivent la distribution des objets dont le rayon est inférieur à 1,3mm (environ 700 fibres), ce qui correspond aux faisceaux primaires et secondaires. En revanche, la granulométrie sur les faisceaux segmentés à partir des images RMN décrit les objets dont le rayon est inférieur à 2,7 mm (environ 3 000 fibres), ce qui correspond à des faisceaux secondaires et tertiaires, caractéristiques du grain de la viande. Chaque taille d'élément structurant est considérée comme une variable. Ainsi l'organisation spatiale du tissu conjonctif est décrite par un très grand nombre de variables, très largement supérieur au nombre d'observations qui ont permis l'ajustement des modèles. De ce fait le traitement des données doit débiter par un tri des variables granulométriques de manière à diminuer le nombre de variables susceptibles d'entrer dans les modèles.

En effet, les images obtenues à partir des coupes histologiques sont décrites par 70 et 42 variables granulométriques, et les images RMN par 48 et 46 variables pour des valeurs respectives du niveau de confiance de 80 et 40%. L'élimination des variables comprenant au moins dix valeurs nulles a réduit le nombre de variables de granulométrie à 27 et 49 pour l'IRM et l'histologie respectivement pour $\varepsilon = 80\%$ et à 25 et 26 variables à 40% (Figure E-6).

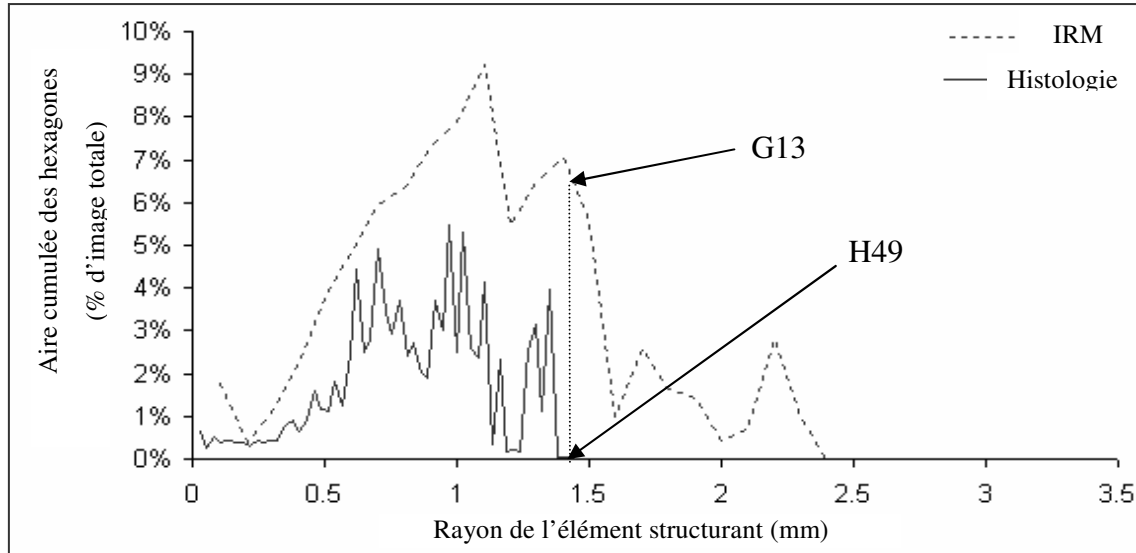


Figure E-6. Exemples de courbes granulométriques obtenues à partir d'une image de muscle *Biceps femoris* (BF) acquises en histologie et en IRM, segmentée par la méthode PMT à 80%. H₄₉ est la taille granulométrique la plus grande pour les images histologiques et elle correspond à G₁₃ sur les images RMN.

Par ailleurs, l'analyse en composantes principales des variables de granulométrie montre que chaque variable est très corrélée avec celle qui la précède et celle qui la suit (Figure E-7). Afin de diminuer encore le nombre de variables (très grand par rapport au nombre d'observations) des plages de corrélation ont été définies grâce à l'algorithme des k-moyennes.

Pour $\varepsilon = 80\%$, huit plages ont été obtenues en IRM (G₁₋₄, G₂, G₅₋₆, G₇₋₁₀, G₁₁₋₁₃, G₁₄₋₁₇, G₁₈₋₂₁ et G₂₂₋₂₆) et quatorze plages en histologie (H₁₋₈, H₉₋₁₁, H₁₂₋₁₄, H₁₅₋₁₆, H₁₇₋₁₉, H₂₀₋₂₁, H₂₂₋₂₄, H₂₅₋₂₈, H₂₉₋₃₄, H₃₅₋₄₀, H₄₁₋₄₄, H₄₅, H₄₆₋₄₈ et H₄₉). Le nombre de plages est plus élevé pour les images des coupes histologiques, car les courbes granulométriques ont une forme plus irrégulière. Elles demandent donc plus de variables pour être décrites (Figure E-6). Les aires cumulées sont plus élevées pour l'IRM que pour l'histologie, car le nombre de classes est réduit en IRM. De plus, la surface relative occupée par chaque taille d'éléments structurants apparaît équivalente sur les images histologiques, alors que sur les images IRM la répartition est moins uniforme (Figure E-6).

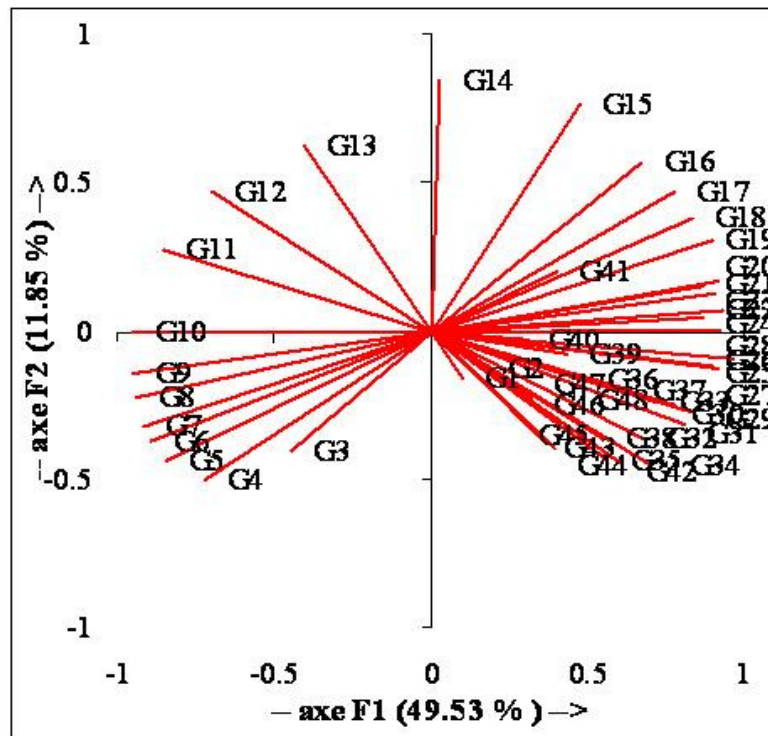


Figure E-7. Analyse en composantes principales des variables granulométriques issues de la segmentation à 80% des images RMN. On peut observer que les variables consécutives sont très corrélées.

Pour $\varepsilon = 40\%$, l'algorithme des k-moyennes permet d'obtenir 8 clusters en IRM (G_1 , G_2 , G_3 , G_{4-6} , G_{7-12} , G_{13-15} , G_{16-19} et G_{20-26}) et 7 en histologie (H_1 , H_2 , H_{3-5} , H_{6-11} , H_{15-18} et H_{19-25}). Le fait que les nombres de clusters soient proches entre les deux modalités d'imagerie pour $\varepsilon = 40\%$ peut être expliqué par des allures similaires des courbes de granulométrie à ce seuil de confiance.

E.3 RELATION ENTRE LA DURETE DE LA VIANDE ET LES CARACTERISTIQUES DU TISSU CONJONCTIF

E.3.1 Relation entre mesures de texture et quantité de collagène

L'analyse en composantes principales (ACP) (Figure E-2) montre que la teneur en collagène est très liée à la contrainte à 80% sur viande cuite et au descripteur sensoriel « résidus ». Ces 3 variables sont très proches de l'axe défini par la première composante principale (F1), qui explique à peu près 40 % de la variance du modèle. Ces trois variables sont également très proches des descripteurs « compact » et « élastique ». A l'opposé, se situent les descripteurs « tendre », « souple » et « collant ». Le descripteur « tendre » est plus corrélé avec la quantité de collagène, qu'il ne l'est avec la contrainte à 80% (C80) ; le coefficient de corrélation R étant respectivement égal à - 0,78 et 0,62. La valeur relativement élevée du coefficient de corrélation entre la tendreté et la quantité de collagène n'est pas surprenante, compte tenu du fait que les types de muscle utilisés pour cette étude présentaient des teneurs en collagène extrêmes. Le descripteur « résidu » est également corrélé significativement avec la quantité de collagène, avec un coefficient de corrélation du même ordre de grandeur que celui obtenu par Rhee *et al.* (2004) (0,62 contre 0,66). En effet, les deux variables sont superposées dans les deux premiers plans de l'ACP. Les variables « résidus » et C80 sont superposées dans le plan généré par F1 et F2 mais ne le sont plus dans le plan F1-F3.

Puisque les variations de teneur en collagène n'expliquaient pas complètement les variations de texture de la viande cuite, nous avons alors cherché à déterminer l'influence sur cette dernière de l'organisation spatiale du périmysium, représentée par les mesures de réseau (surface et longueur) et les tailles de faisceaux de fibres (variables granulométriques triées et regroupées) déterminées sur les images histologiques et RMN segmentées par PMT aux niveaux de confiance de 80 et 40%.

E.3.2 Modèles construits à partir d'une segmentation au niveau de confiance de $\epsilon = 80\%$

E.3.2.1 Prédiction de la dureté (C80cuit)

La quantité de collagène ne permet pas d'expliquer complètement les variations de dureté instrumentale ($R^2 = 0,32$), exprimée ici par la contrainte développée en compression

sur viande cuite, C80cuit (Figure E-8). Dransfield (1977) a présenté une corrélation légèrement supérieure ($R^2 = 0,40$) entre la teneur en collagène total et la force de compression sur de la viande cuite 20 min à 60°C. Par ailleurs, la relation entre la quantité de collagène et la dureté semble être spécifique à chaque type de muscle. En effet, les muscles « tendres » comme les muscles LT et IS formaient des groupes bien individualisés. En revanche, les muscles « durs », comme le BF et le PP, constituaient des nuages de points difficiles à individualiser.

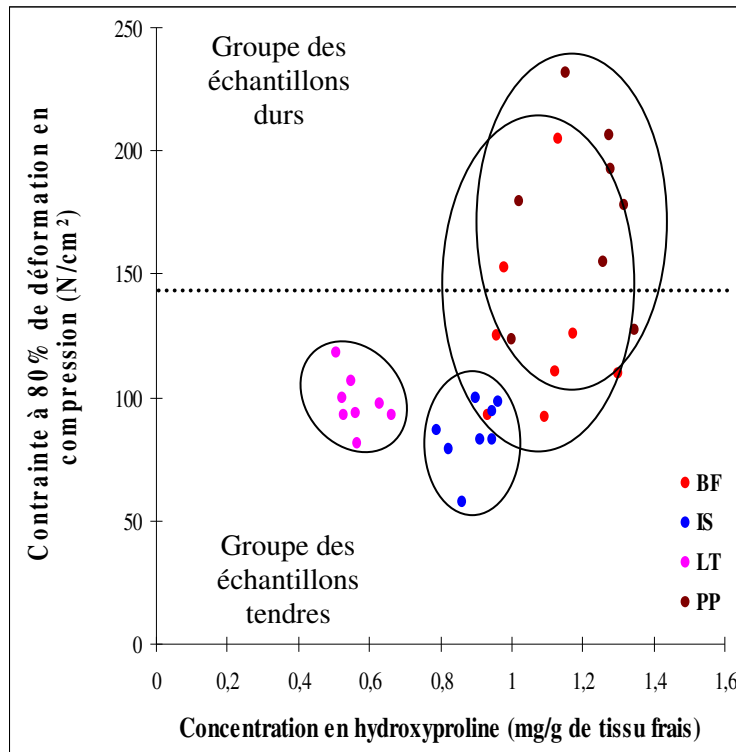


Figure E-8. Répartition des types de muscles selon leur teneur en collagène et leur dureté sur viande cuite.

Pour effectuer une classification par analyse générale discriminante (AGD), les 32 échantillons ont été séparés en deux groupes selon la méthode des k-moyennes, établissant le seuil de C80cuit à environ 145 N/cm². Le groupe des muscles « durs » comprenait la plupart des muscles PP et seulement quelques BF. Le groupe des muscles « tendres » était constitué de tous les muscles IS et LT et la plupart des BF (Figure E-8). Il n'est pas surprenant que le groupe des muscles « durs » fût constitué d'échantillons de BF et PP, réputés pour être des muscles à faible potentiel de tendreté. Cependant, une partie des échantillons de ces types de muscle ont été placés parmi les muscles « tendres ». Les 21 jours de maturation des échantillons ont très certainement réduit considérablement la part myofibrillaire de la dureté,

réduisant ainsi les différences de dureté entre les échantillons. Il devenait alors moins facile de distinguer les différents types de muscle.

Une dernière étape de tri a encore permis de réduire le nombre de variables à proposer pour la construction des modèles. Une ANOVA à une voie a permis de désigner les variables capables de discriminer les deux groupes de dureté ($p < 0,05$). La variance relative expliquée devait être supérieure à 20% pour que la variable soit retenue. Seules six variables ont été significativement discriminantes ($p < 0,05$) des deux groupes de dureté sur les vingt-sept proposées (Figure E-9). On retrouve les variables : collagène, surfIRM, G_{7-10} , G_{11-13} , G_{18-21} et G_{22-26} . Il est à noter qu'aucune variable issue de l'analyse des images des coupes histologiques n'a été discriminante.

Parmi les variables retenues, seules deux ou trois ont été choisies par l'algorithme « best subset » d'AGD, de manière à ne pas fabriquer un modèle surparamétré, compte tenu du nombre d'observations. Le meilleur modèle obtenu combine trois variables de granulométrie issues de l'IRM : G_{18-21} , G_{7-10} et G_{11-13} , dans l'ordre d'entrée dans le modèle (Tableau E-14). Il classe correctement 92% des échantillons des groupes d'apprentissage et de validation et 88% des échantillons de test. Ces résultats modestes en test amènent à rester prudent quant à l'interprétation de ce modèle. Cependant on peut noter qu'en moyenne, la variable G_{18-21} est plus élevée dans le groupe tendre, alors que G_{7-10} et G_{11-13} sont plus élevées dans le groupe dur (Tableau E-14). La variable G_{14-17} , n'étant pas significativement différente entre les deux groupes de dureté ($p > 0,05$), pourrait être indicative d'une valeur de taille-seuil entre les petits et grands faisceaux. Cette valeur correspondrait à la taille des objets de rayon compris entre 1,4 et 1,7 mm. Il est à noter que le modèle incluant uniquement la quantité de collagène conduit à un plus grand nombre d'erreurs de classement que le modèle n°1 (Tableau E-14).

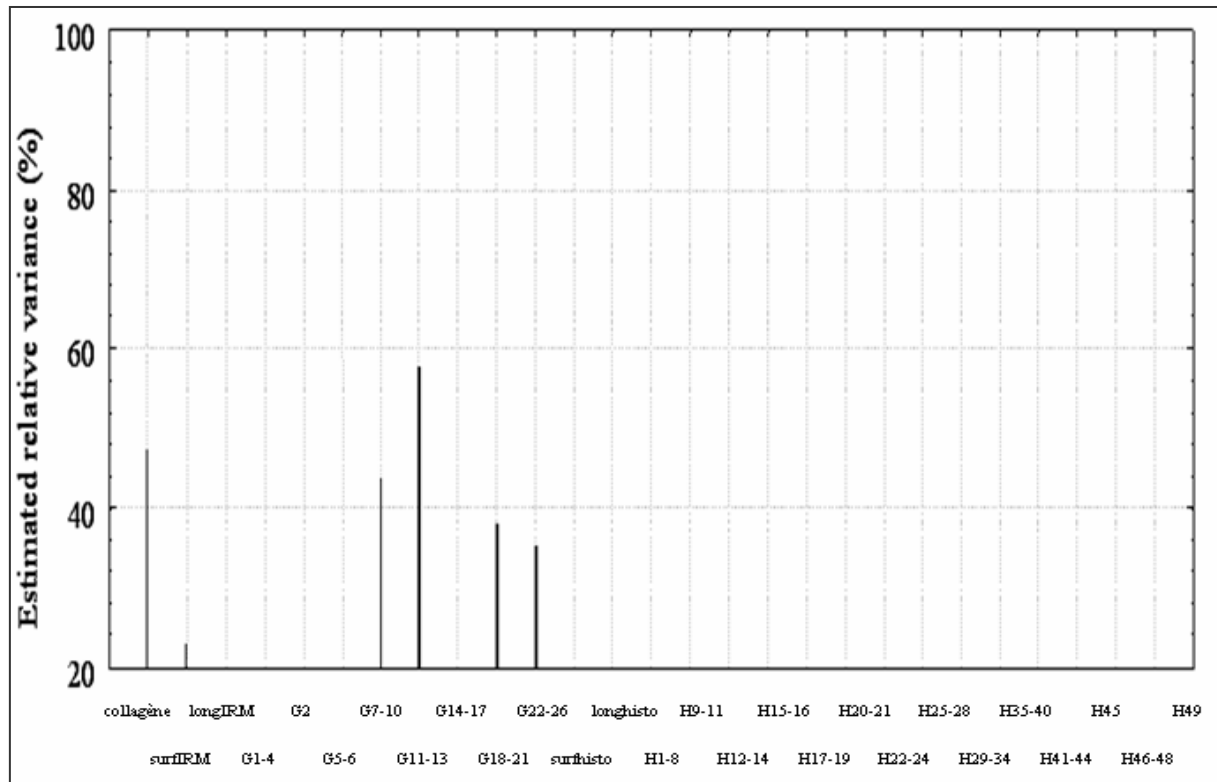


Figure E-9. ANOVAgramme de la contribution du facteur dureté instrumentale (C80cuit) aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 27 variables biochimiques (collagène) et “ image”. La variance relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l’ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$.

Tableau E-14. Caractéristiques des modèles obtenus en analyse générale discriminante par l’algorithme « best subset », pour prédire la dureté instrumentale (C80cuit) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d’image totale)		% d’échantillons correctement classés		
		Dur	Tendre	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	G ₁₈₋₂₁	0,32	0,23	91,7	87,5	90,6
	G ₇₋₁₀	0,22	0,17			
	G ₁₁₋₁₃	0,03	0,07			
2	Collagène	1,18	0,86	83,3	75	81,3

E.3.2.2 Prédiction de la tendreté

Comme pour la dureté instrumentale, la relation entre la quantité de collagène et la tendreté est dépendante du type de muscle. Si les muscles IS et LT constituent des populations bien distinctes, les muscles BF et PP ne forment pas des groupes séparés (Figure E-10). L'algorithme des k-moyennes a séparé les échantillons en deux groupes « durs » et « tendres ». Le seuil a été établi à 5,3, valeur proche du milieu de l'échelle de gradation proposée aux dégustateurs, allant de 0 à 10 (Figure E-10). Si les muscles IS sont répartis entre les deux groupes, tous les muscles BF et PP sont dans le groupe des muscles durs et tous les muscles LT sont dans le groupe des muscles tendres (Figure E-10).

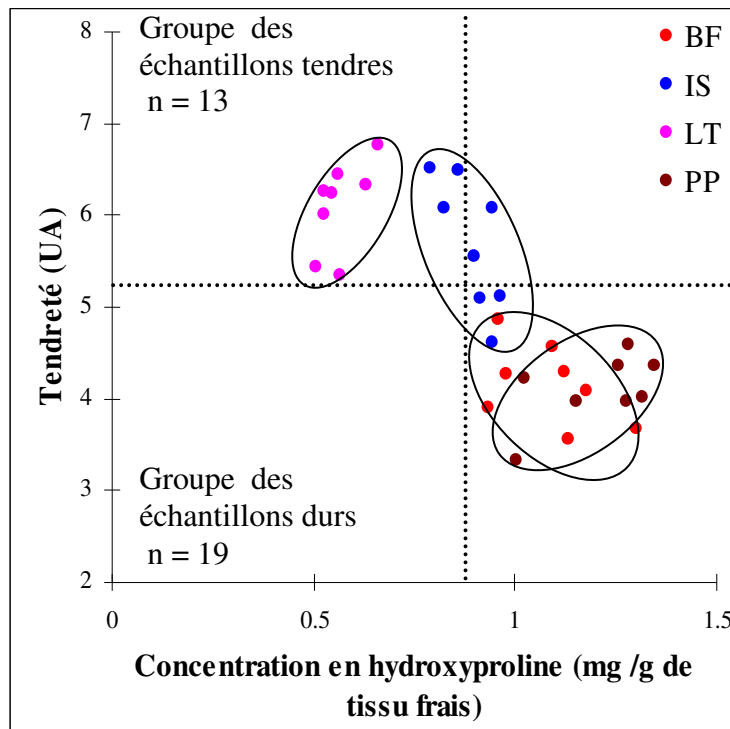


Figure E-10 Répartition des types de muscles selon leur teneur en collagène (concentration d'hydroxyproline) et leur tendreté sensorielle (sans dimension).

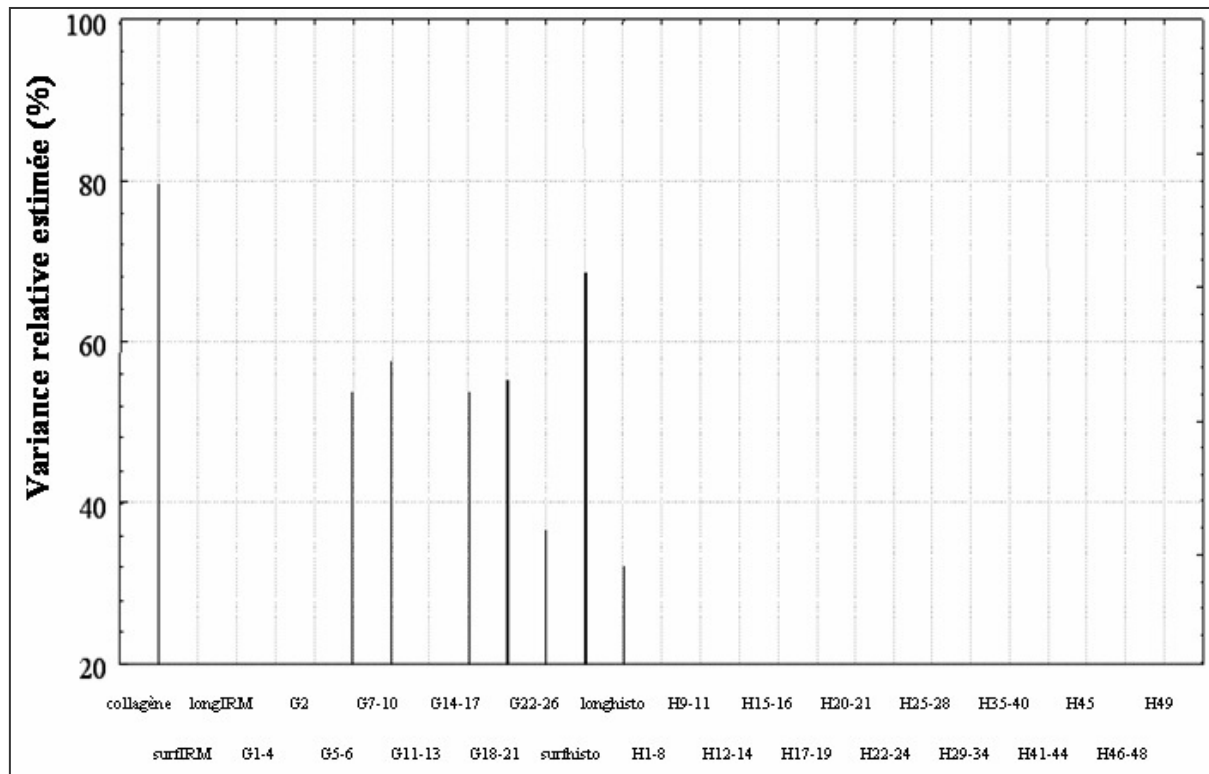


Figure E-11. ANOVagramme de la contribution du facteur tendreté sensorielle aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 27 variables biochimiques (collagène) et “image”. La variance relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l’ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$.

L’ANOVA à une voie a identifié neuf variables sur vingt-sept qui différencient significativement ($p < 0,05$) les deux classes de tendreté (Figure E-11). Aucune variable granulométrique issue des images histologiques n’a été retenue. Parmi les variables retenues, seules deux ou trois seront choisies par l’algorithme d’AGD.

Tous les meilleurs modèles proposés par l’algorithme combinent avec des poids équilibrés deux variables : une variable granulométrique issue des images IRM et une variable mesurant le réseau sur les images des coupes histologiques (surfhisto ou longhisto). Le meilleur d’entre eux combine G_{7-10} et longhisto (Tableau E-15). De plus les modèles obtenus avec des variables issues de l’une des modalités d’imagerie sont de moins bons prédicteurs du facteur tendreté sensorielle que le modèle n°1 (Tableau E-15). Ceci confirme que les deux modalités d’imagerie apportent des informations complémentaires quant à la prédiction de la tendreté sensorielle.

Le modèle n°1 classe correctement 100% des échantillons d’apprentissage/validation et 87,5% des échantillons de test, soit au total 97% d’échantillons bien classés (Tableau E-15). Les valeurs des moyennes des prédicteurs pour chaque classe indiquent que la longueur du réseau est plus élevée pour les échantillons les plus durs (Tableau E-15), montrant ainsi que

les muscles durs possèdent un perimysium plus ramifié. De plus les échantillons durs ont significativement ($p < 0,05$) plus d'objets de la classe G_{7-10} ($0,7 \leq \text{rayons} \leq 1 \text{ mm}$) (Tableau E-15). Ceci indique que la surface totale occupée par les objets de petite taille est plus élevée pour les échantillons durs.

Dans les modèles à une variable, la quantité de collagène est la seule variable retenue et le modèle classe correctement seulement 75% des échantillons d'apprentissage/validation et 100% des échantillons de test, soit au total 94% d'échantillons bien classés (Tableau E-15). De plus, le meilleur modèle combinant trois variables prédictives combine G_{7-10} , longhisto et la teneur en collagène. Cependant les performances de ce modèle ne sont pas supérieures au modèle n°1, composé de deux variables. Le modèle à deux variables sera donc retenu, de façon à limiter le nombre de variables du modèle. En conclusion les variables « images » G_{7-10} et longhisto contiennent déjà une grande part de l'information apportée par la quantité de collagène concernant les variations de tendreté sensorielle.

Tableau E-15. Caractéristiques du meilleur modèle obtenu en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la tendreté sensorielle des échantillons cuits 30 min à 65°C pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d'image totale)		% d'échantillons correctement classés		
		Dur	Tendre	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	G_{7-10}	0,18	0,26	100	87,5	96,9
	Longhisto	1,42	1,83			
2	Collagène	1,11	0,68	75	100	81,3
3	Variables histo	/	/	91,7	62,5	84,4
4	Variables IRM	/	/	91,7	87,5	90,6

E.3.2.3 Prédiction de la quantité de collagène

La limite séparant les deux classes basées sur la quantité de collagène a été 0,85 mg OH-Pro/g muscle frais (Figure E-10). Le groupe des échantillons pauvres en collagène contient tous les muscles LT et deux muscles IS, tandis que le groupe des muscles riches en collagène

contient tous les muscles BF et PP et la plupart des muscles IS. Aucune variable granulométrique issue des images histologiques n'a été retenue.

L'ANOVA a permis de conserver huit variables significatives ($p < 0,05$) parmi les vingt-six variables « image » proposées, capables de distinguer les muscles selon le facteur quantité de collagène (Figure E-12).

Le meilleur modèle désigné par l'algorithme « best subset » utilise les mêmes variables explicatives que celui prédisant la tendreté sensorielle (G_{7-10} et $longhisto$) (Tableau E-16). Cependant il conduit à classer correctement 96% des échantillons apprentissage/validation et seulement 63% des échantillons de test, soit plus de 87% du total des échantillons. Les moyennes des deux prédicteurs sont plus élevées pour le groupe des muscles riches en collagène (Tableau E-16). Ainsi les muscles contenant plus de collagène possèdent plus de faisceaux de la taille 0,7 à 1 mm de rayon et leur périmysium est plus long.

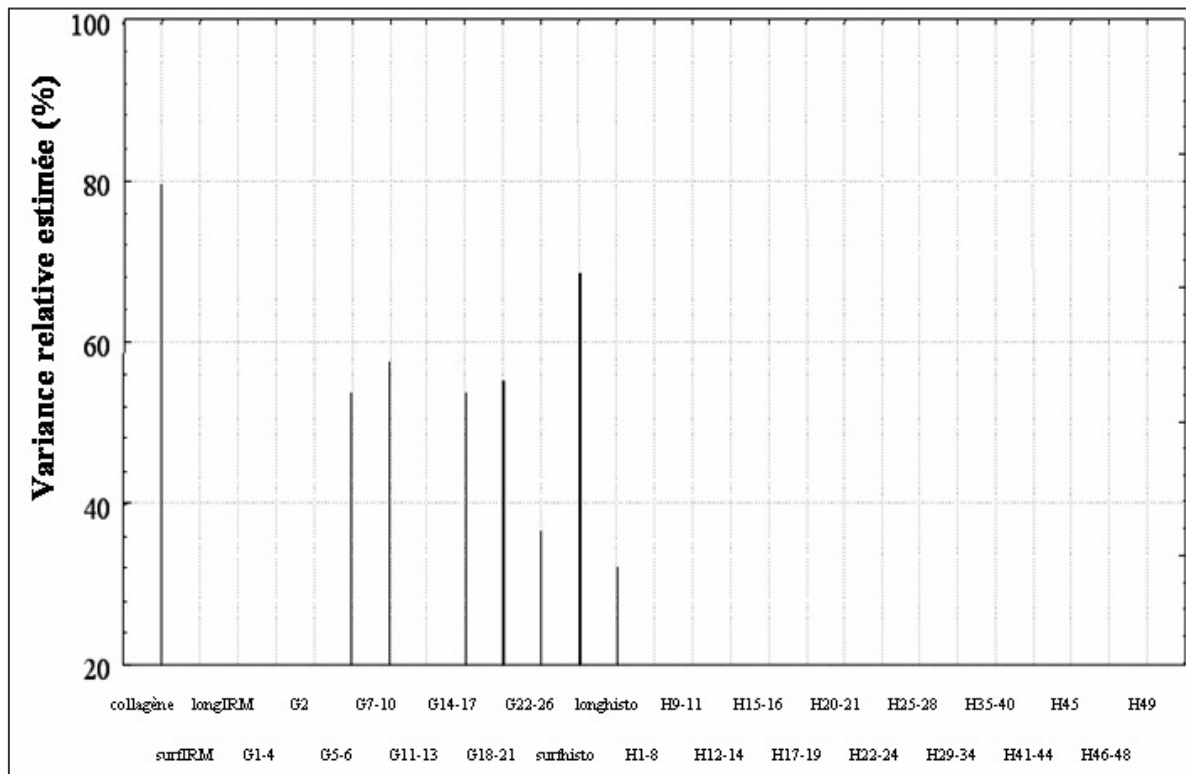


Figure E-12. ANOVagramme de la contribution du facteur quantité de collagène aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 26 variables « image ». La variance relative égale à 20% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Tableau E-16. Caractéristiques du meilleur modèle obtenu en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la concentration de collagène des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 80\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d'image totale)		% d'échantillons correctement classés		
		Pauvre	Riche	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	G ₇₋₁₀	0,18	0,26	95,8	62,5	87,5
	Longhisto	1,42	1,83			

E.4 MODELES CONSTRUITS A PARTIR D'UNE SEGMENTATION AU NIVEAU DE CONFIANCE $\varepsilon = 40\%$

Les mêmes classes de dureté, tendreté et quantité de collagène, déterminées par l'algorithme des k-moyennes, ont été reprises pour ce second groupe de modèles, pour $\varepsilon = 40\%$.

E.4.1.1 Prédiction de la dureté (C80cuit)

L'ANOVA à une voie a permis de retenir cinq variables significatives permettant de distinguer les deux classes de C80cuit ($p < 0,05$) parmi les vingt proposées. Le seuil de signification a été placé à 19% de variance relative expliquée. Aucune variable issue des images des coupes histologiques n'a été retenue. La variable de réseau IRM (surfIRM) apparaît significative ($p < 0,05$), contrairement au cas de la segmentation pour $\varepsilon = 80\%$ (Figure E-13).

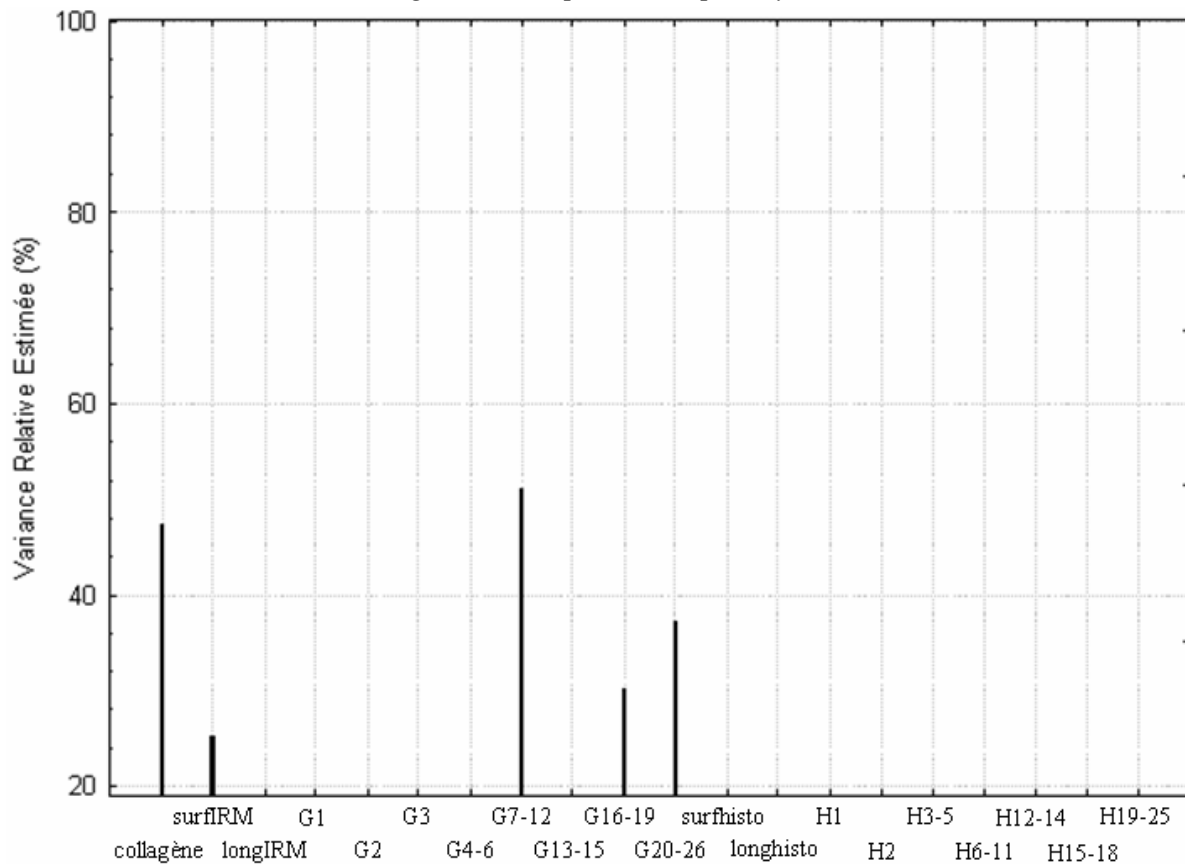


Figure E-13. ANOVagramme de la contribution du facteur C80cuit aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables “ image”. La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l’ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Aucun modèle n’utilise la quantité de collagène. Le meilleur modèle se compose de surfIRM et G₇₋₁₂. Il classe correctement 87,5% des échantillons (Tableau E-17). Le meilleur modèle à trois variables introduit en plus la variable G₁₆₋₁₉. Il reste, cependant, moins performant que celui à deux variables qui a donc été retenu. La variable G₇₋₁₂ est plus élevée dans la classe des échantillons les plus durs que dans celle des plus tendres. Elle rappelle la variable G₇₋₁₀ retenue dans tous les modèles issus de la segmentation à $\varepsilon = 80\%$. En revanche, la variable SurfIRM remplace la variable longhisto. Il est à noter que contrairement aux observations précédentes, les échantillons les plus tendres possèdent une surface de réseau en IRM plus étendue que celle des muscles les plus durs. Ceci est probablement lié aux muscles IS, appartenant au groupe des muscles « tendres », mais dont les images sont traversées par une large trame d’épimysium. Le fait que ces modèles soient très influencés par une particularité anatomique d’un type de muscle peut en partie expliquer les résultats modestes obtenus en test.

Tableau E-17. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire le C80cuit des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d'image totale)		% d'échantillons correctement classés		
		Dur	Tendre	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	surfIRM	14,05	22,53	87,5	87,5	87,5
	G ₇₋₁₂	0,48	0,34			
2	surfIRM	14,05	22,53	83,3	62,5	78,1
	G ₇₋₁₂	0,48	0,34			
	G ₁₆₋₁₉	0,075	0,113			

E.4.1.2 Prédiction de la tendreté

L'ANOVA une voie a retenu, dans ce cas, neuf variables significatives ($p < 0,05$) parmi les vingt proposées. Le seuil de signification a été placé à 18% de variance relative expliquée. Les variables granulométriques des images histologiques sont significatives ($p < 0,05$) pour ce facteur, contrairement à ce qui a été obtenu avec la segmentation à $\varepsilon = 80\%$ (Figure E-14).

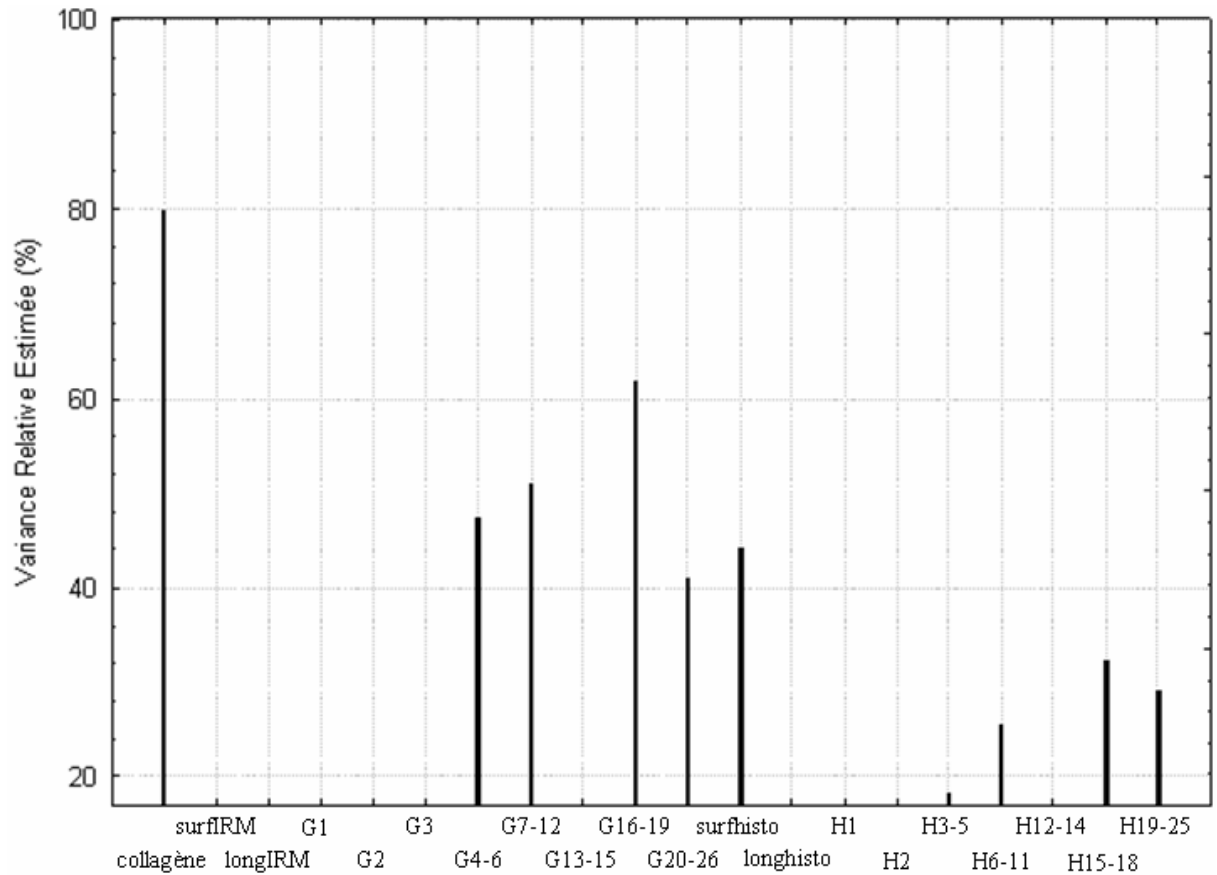


Figure E-14. ANOVagramme de la contribution du facteur tendreté aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables “ image”. La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l’ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Le meilleur modèle proposé par l’algorithme « best subset » composé de deux variables utilise les variables G_{7-12} et H_{15-18} (Tableau E-18). Il combine donc l’information issue de la granulométrie des deux modalités d’imagerie. Il permet de classer correctement 100% des échantillons du groupe apprentissage/validation, mais seulement 62,5% des échantillons de test. Les performances s’améliorent avec 75% d’échantillons de test correctement classés, en ajoutant une troisième variable prédictive, surfhisto. Les autres modèles combinant trois variables conduisent aux mêmes performances qu’avec deux variables. Le modèle n°2, combinant les variables G_{7-12} , surfhisto et H_{15-18} , a donc été retenu.

La moyenne de G_{7-12} , correspondant à des objets de taille 0,7 à 1,2 mm, est toujours plus élevée pour le groupe des échantillons durs. Il en est de même pour surfhisto. Par contre la moyenne de H_{15-18} , correspondant à des objets de taille 400 à 500 μm , est plus élevée pour les échantillons tendres.

Tableau E-18. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la tendreté sensorielle des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d'image totale)		% d'échantillons correctement classés		
		Dur	Tendre	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	G ₇₋₁₂	0,42	0,25	100	62,5	90,6
	H ₁₅₋₁₈	0,076	0,119			
2	G ₇₋₁₂	0,42	0,25	100	75	93,7
	surfhisto	16,8	14,1			
	H ₁₅₋₁₈	0,076	0,119			

E.4.1.3 Prédiction de la teneur en collagène

L'ANOVA à une voie a permis de retenir, parmi les dix-neuf proposées, treize variables significatives permettant de distinguer les deux classes de collagène ($p < 0,05$). Toutes les variables issues des images en histologie sont significatives ($p < 0,05$) pour le facteur collagène, contrairement aux variables issues de la segmentation à 80% (Figure E-15). Seules quatre variables granulométriques IRM sont significativement différentes pour le facteur collagène ($p < 0,05$).

Le meilleur modèle à deux variables obtenu avec l'algorithme « best subset » combine deux variables granulométriques, l'une issue de l'IRM et l'autre issue de l'histologie : G₇₋₁₂ et H₃₋₅ (Tableau E-19). Il permet de classer correctement 96% des échantillons du groupe apprentissage/validation et 87,5% des échantillons de test. Les mêmes performances sont obtenues avec le modèle n°2 à trois variables. Le modèle n°1 sera donc retenu, puisque le nombre de variables dans les modèles doit être limité. Avec le modèle n°3 composé uniquement de variables issues des images histologiques seulement 87,5% d'échantillons sont bien classés contre 94% pour les modèles n°1 et 2, confirmant une fois de plus la complémentarité des deux modalités d'imagerie.

Par ailleurs, il semble hasardeux d'utiliser la variable H₁. En effet, cette classe rassemble des objets de très petite taille de rayon inférieur ou égal à 27 μm . Or il s'agit du rayon moyen d'une fibre musculaire. Ces objets ne peuvent en aucun cas être des faisceaux de périnysium. Ce sont donc des artefacts de segmentation, sensible au bruit sur les images.

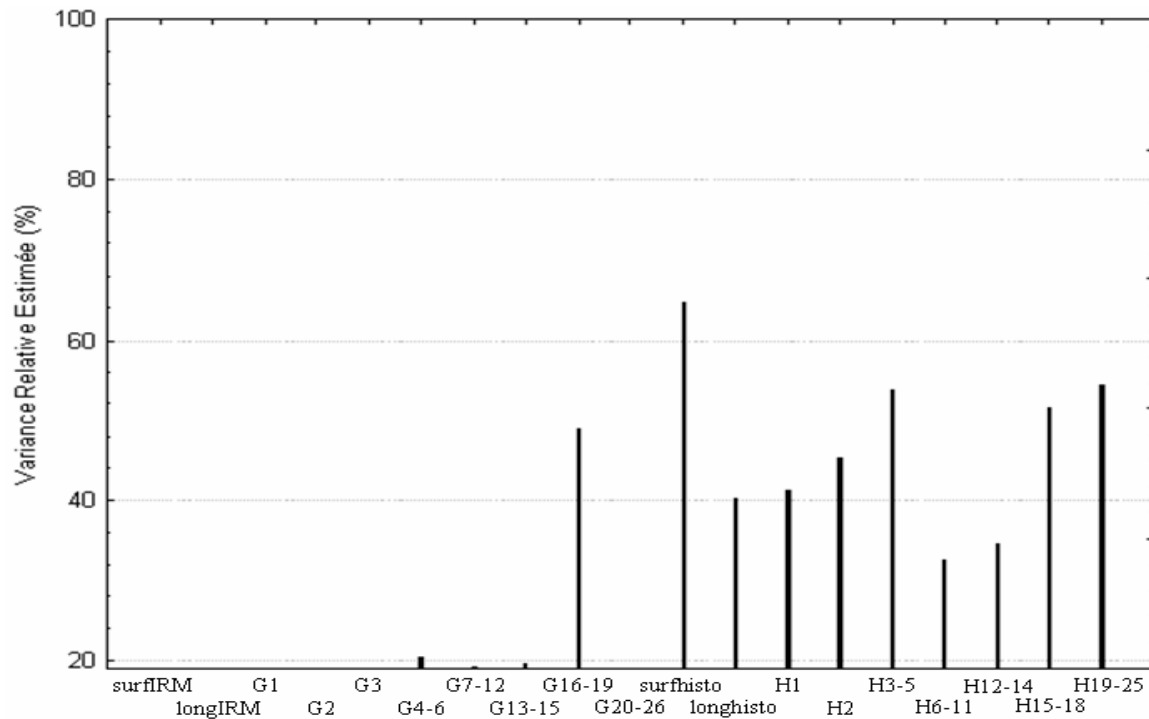


Figure E-15. ANOVagramme de la contribution du facteur quantité de collagène aux variations de la variance relative estimée pour chacune des 19 variables « image ». La variance relative égale à 19% détermine le seuil de signification de l'ANOVA à une voie ($p < 0,05$) pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Tableau E-19. Caractéristiques des meilleurs modèles obtenus en analyse générale discriminante (AGD) pour prédire la concentration de collagène des échantillons pour une segmentation avec $\varepsilon = 40\%$.

Modèle	Variables	Moyennes de la classe (% d'image totale)		% d'échantillons correctement classés		
		Pauvre	Riche	Apprentissage + Validation (n = 24)	Test (n = 8)	Total (n = 32)
1	G ₇₋₁₂	0,279	0,377	95,8	87,5	93,7
	H ₃₋₅	0,079	0,143			
2	G ₇₋₁₂	0,279	0,377	95,8	87,5	93,7
	longhisto	4,98	6,12			
	H ₁	0,025	0,038			
3	surffhisto	13,3	16,7	91,7	75	87,5
	longhisto	4,98	6,12			
	H ₁	0,025	0,038			

E.4.2 Discussion sur les modèles retenus

E.4.2.1 Comparaison entre les deux modalités d'imagerie

La granulométrie réalisée sur les images IRM joue un rôle majeur dans les modèles prédisant la dureté instrumentale et la tendreté des échantillons de viande analysés dans cette étude. Les variables, qui en sont issues, sont les plus discriminantes et apparaissent dans tous les modèles. Elles renseignent sur les faisceaux macroscopiques de myofibres et donc sur la structure du pérимysium épais. Cependant, les mesures (surface et longueur) du réseau conjonctif observé en IRM ne contribuent à aucun modèle dans le cas de la segmentation à 80%, et seulement au modèle prédisant la dureté pour la segmentation à 40 %. La méthode de susceptibilité magnétique utilisée pour les acquisitions IRM conduit à une surestimation de l'épaisseur des objets contenus dans les images (chap. E.2.4.1). Cet épaissement induit une plus forte erreur relative sur les objets linéaires les plus fins (épais de un ou deux pixels) que sur les objets convexes comme des hexagones. De plus, la variable surfIRM a été biaisée à cause du muscle IS, contenant une large trame épимysiale.

Certaines variables histologiques complètent les modèles. Pour $\varepsilon = 80\%$, ce sont, contrairement à l'IRM, les variables caractérisant le réseau et non les variables granulométriques qui sont les plus pertinentes. Les variables granulométriques issues des images histologiques segmentées à 80 %, ne permettent pas, en effet, de discriminer significativement les échantillons pour les différents critères de classification proposés ($p > 0,05$). Ceci peut être expliqué par une segmentation du réseau incomplète. En effet, après une segmentation plus poussée (pour $\varepsilon = 40\%$), une variable granulométrique issue de l'histologie (H₁₅₋₁₈) est alors intégrée dans le modèle prédisant la tendreté.

L'histologie apporte des informations dans un champ de vue plus restreint que celui analysé en IRM. Les objets identifiés sont donc de taille inférieure à celle des objets mis en évidence en IRM. Ainsi, les courbes granulométriques se chevauchent-elles : la variable H₄₉, plus grande variable granulométrique retenue en histologie (à $\varepsilon = 80\%$) renseignant sur les objets de 1,3 mm de rayon, correspond à G₁₃ située au milieu de la courbe IRM (Figure E-6). Par ailleurs, seule la partie centrale des courbes granulométriques est pertinente. Le début de ces courbes, biaisé à cause des limites de la résolution, est très sensible au bruit contenu dans les images. La fin des courbes est également biaisée car les objets de grande taille ne sont pas représentés en nombre suffisant. Ainsi, est-il nécessaire d'utiliser à la fois l'IRM et l'histologie afin de couvrir au mieux les différents niveaux d'organisation.

E.4.2.2 Comparaison entre les modèles prédisant la dureté et la tendreté

Le meilleur modèle prédisant la dureté instrumentale (C80cuit) de la viande comporte uniquement des variables de granulométrie issues des observations en IRM, alors que le meilleur modèle prédisant la tendreté sensorielle combine des variables IRM et histologiques, quel que soit le niveau de confiance (40 ou 80%) de la segmentation.

Ces différences peuvent être expliquées par le fait que la tendreté est une propriété qui pour être perçue nécessite de prendre en compte l'ensemble du processus de mastication, conduisant de la viande en l'état à un bol alimentaire de structure homogène. Ce processus entraîne la dégradation progressive et quasi complète des différents niveaux de structuration de la viande et en conséquence du réseau conjonctif, même aux niveaux les plus fins. Une telle déstructuration n'est jamais atteinte au cours des tests de compression. Ceci explique pourquoi l'information apportée par les structures conjonctives les plus fines n'est pas nécessaire pour expliquer les variations de C80cuit, mais est, en revanche, intégrée dans les modèles prédicteurs de la tendreté.

Le même raisonnement peut être conduit pour les modèles prédicteurs de la teneur en collagène. Les variables de réseau en histologie sont mieux corrélées à la teneur en collagène que ne le sont les variables IRM, et la corrélation entre la tendreté sensorielle et le collagène est plus étroite que celle entre C80cuit et collagène. Ainsi le modèle de prédiction du C80cuit ne nécessite pas d'inclure l'information sur la teneur en collagène que pourrait apporter la mesure de réseau en histologie.

Les structures influençant la texture

La variable G_{7-10} à $\varepsilon = 80\%$ (et son homologue G_{7-12} à $\varepsilon = 40\%$) apparaît dans tous les meilleurs modèles, quelque soit le facteur à prédire. Elles définissent l'occurrence des objets dont le rayon est compris entre 0,7 et 1 (ou 1,2) mm, ce qui correspond à de petits objets pour l'échelle IRM et de grands objets pour l'échelle histologique. En effet, cette variable se situe à la frontière entre les deux modalités d'imagerie utilisées au cours de cette étude. Ainsi la surface occupée par ces objets (et donc leur nombre) jouerait un rôle majeur sur le déterminisme de la tendreté de la viande. En effet, nos résultats montrent que les muscles les plus durs possèdent une plus grande proportion de faisceaux secondaires de fibres musculaires visibles en IRM (0,7 à 1,2 mm de rayon, soit 800 à 2 200 fibres).

De manière complémentaire, les faisceaux tertiaires (de plus grandes dimensions) caractérisés par les variables G_{18-21} (caractérisant les objets de 1,8 à 2,1 mm de rayon) à $\varepsilon = 80\%$ et G_{16-19} (caractérisant les objets de 1,6 à 1,9 mm de rayon) pour $\varepsilon = 40\%$, qui

représentent les faisceaux tertiaires et qui sont rencontrés en plus grande proportion dans les échantillons les plus tendres.

En IRM, les structures observées (faisceaux) sont d'ordres secondaires, tertiaires et au-delà, puisque cette modalité d'imagerie permet une acquisition des images dans un champ de vue plus large et une résolution spatiale inférieure à celle de l'histologie. Les images RMN des muscle LT et IS comportent donc peu de segments, figurant ainsi un réseau ouvert et peu dense. La granulométrie de ces échantillons en IRM indique donc une majorité d'objets de grande taille. Au contraire, les muscles durs comme BF et PP présentent un niveau de périmysium plus ramifié et structuré et leurs courbes granulométriques en IRM font apparaître une majorité de petits objets.

Plusieurs études antérieures (Hammond, 1932 ; Ramsbottom *et al.*, 1945 ; Strandine *et al.*, 1949 ; Cooper *et al.*, 1968 ; Norman, 1982) ont conclu que les viandes tendres étaient issues de muscles présentant de petits faisceaux de fibres. Tous ces auteurs ont cependant fondé leurs conclusions sur l'étude de coupes musculaires histologiques, observant et caractérisant les faisceaux primaires, *i.e.* les niveaux d'organisation juste supérieurs à la fibre musculaire.

A l'échelle de l'histologie, seule la variable H_{15-18} à $\varepsilon = 40 \%$ apparaît pertinente pour prédire la tendreté. Cette variable est caractéristique des petits faisceaux (60 à 100 fibres), de rayon 400 - 500 μm , qui sont présents en majorité dans les échantillons de viande les plus tendres.

Ainsi nos résultats confirment les études précédentes, dans le sens où les muscles tendres possèdent plus de petits faisceaux visibles en histologie. Ils sont cependant en contradiction avec les conclusions de Brady (1937), qui indique que les muscles tendres comme le Longissimus thoracis ont des faisceaux de 800 μm de rayon contre 400 μm pour un muscle plus dur comme le Semitendinosus. En effet, les muscles les plus durs sont caractérisés par un plus grand nombre de faisceaux de taille intermédiaire (0,7 à 1,2 mm) perçus comme grands à l'échelle histologique, mais petits à l'échelle IRM. De plus, les muscles chez lesquels prévalent les faisceaux les plus grands (non observables dans les conditions d'histologie classiques mais analysés en IRM) sont à l'origine d'une viande tendre (Figure E-16 et Figure E-17).

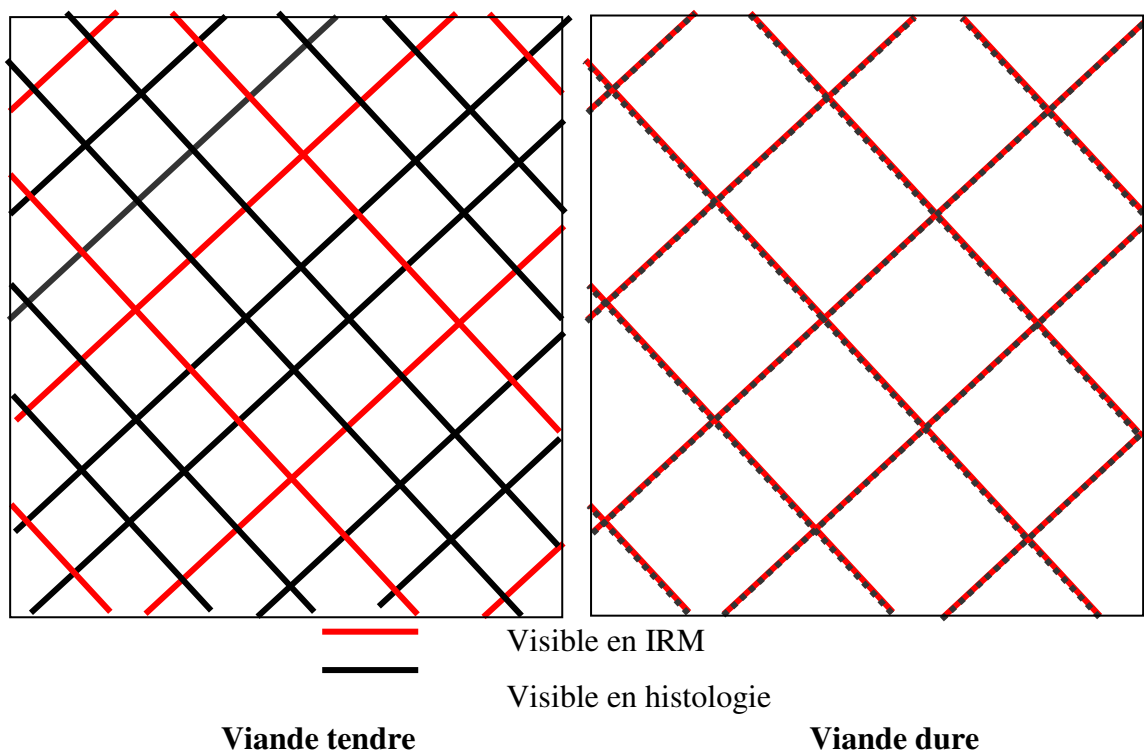


Figure E-16. Représentation schématique des résultats obtenus après interprétation des modèles d'analyse générale discriminante. Les muscles tendres possèdent plus de petits faisceaux primaires que les muscles durs.

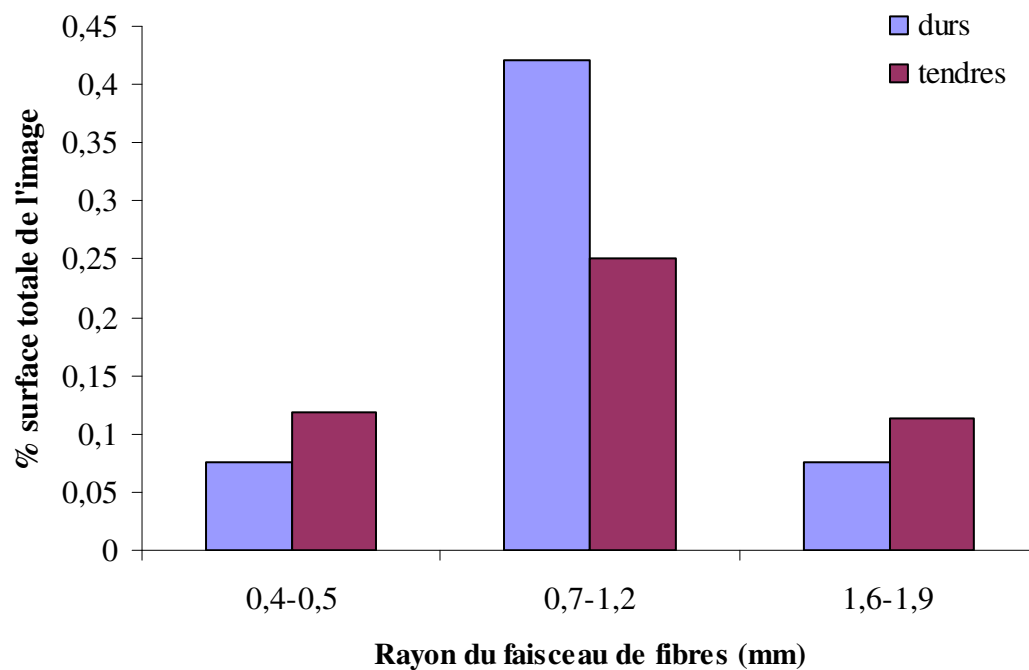


Figure E-17. Profil de répartition des tailles de granulométrie majeures, expliquant les variations de texture.

E.5 CONCLUSIONS

Les deux modalités d'imagerie (histologie et IRM) apportent des informations complémentaires sur l'organisation spatiale du tissu conjonctif, l'IRM à un niveau macroscopique et l'histologie à une échelle plus fine et plus résolutive. Les deux échelles sont nécessaires pour prédire la tendreté sensorielle, mais seule l'organisation macroscopique observée en IRM est nécessaire pour prédire la dureté instrumentale. Les résultats de cette étude indiquent que les muscles avec de petits faisceaux sont plus tendres que des muscles comportant de grands faisceaux.

L'influence majeure de la structure macroscopique confirme l'intérêt dans la mise au point d'outils rendant possible l'étude d'échantillons de viande avec de larges champs de prise de vue (des tranches de muscle entiers par exemple). Cependant la technologie IRM n'est pour l'instant pas applicable en ligne pour une analyse de routine dans les abattoirs. Il reste donc à développer une méthode d'imagerie plus simple d'application, comme par exemple l'acquisition d'images de tranches entières à des longueurs d'onde permettant d'exploiter les propriétés spectrales spécifiques des différents composants du tissu conjonctif (Skjervold *et al.*, 2003).

Les résultats de cette étude doivent cependant être recadrés puisqu'ils ont été obtenus sur des échantillons de viande maturés et cuits de manière spécifique. En effet le mode de cuisson utilisé (65°C pendant 30 min) est typique de la température interne préférée par la plupart des consommateurs français. Il a induit des niveaux limités de dénaturation des myofibres et du collagène et de contraction du collagène. Des températures de cuisson plus élevées auraient entraîné une expression différente des propriétés respectives des myofibres et du tissu conjonctif sur la tendreté de la viande. Ainsi ces résultats requièrent une validation sur une gamme plus large de types de muscles et d'animaux, ainsi qu'avec d'autres conditions de cuisson avant de généraliser les hypothèses issues des modèles développés.

F. CARTOGRAPHIE DE LA TRAME CONJONCTIVE

La variation de la répartition en protéines, protéoglycannes et lipides du tissu conjonctif peut aussi expliquer une part de la variabilité de la texture de la viande. Du type de muscle dépendent, notamment les quantités de collagène, d'élastine ou de lipides. Les principales molécules composant le tissu conjonctif intramusculaires sont les collagènes de type I, III, IV, VI, XII et XIV (Listrat A. *et al.*, 1998 ; Listrat *et al.*, 2000), l'élastine, la décorine et les lipides. Dans un premier temps, ces molécules ont été localisées à l'aide de marquages immunologiques dans les muscles *Biceps femoris* (BF), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT) et *Pectoralis profundus* (PP) afin de réaliser une cartographie moléculaire du tissu conjonctif (également nommé matrice extra-cellulaire). Dans un second temps, nous avons cherché une relation entre les variations de composition du tissu conjonctif périmysial et l'organisation du tissu conjonctif au sein du muscle, notamment l'épaisseur du périmysium et la répartition des lipides.

Cela devrait nous aider à mieux comprendre les rôles des différents composants de la matrice extra-cellulaire dans sa mise en place.

F.1 LOCALISATION DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

F.1.1 Collagène de type I

Le collagène de type I est la molécule majoritaire du tissu conjonctif intramusculaire. Il est présent dans l'endomysium et surtout dans le périmysium (Figure F-1), ce qui corrobore les résultats publiés résumés dans le tableau A-2. Les fibres de collagène de type I sont organisées de manières différentes selon l'épaisseur du périmysium et donc selon les types de muscles. A certains endroits du périmysium épais du muscle BF, la trame est ponctuée de coupures nettes sans destruction apparente du tissu contigu (Figure F-1), laissant penser que les fibres de collagène sont rassemblées en faisceaux délimités, orientés dans la direction du grand axe des fibres musculaires et perpendiculaire à l'axe de coupe. Dans l'IS, le périmysium est fin. Dans ce cas, le marquage met en évidence les fibres de collagène I, toutes orientées perpendiculairement aux fibres musculaires et organisées en un seul feuillet ondulé (Figure F-1). Dans le LT présentant un périmysium également fin et la structure est quasiment la même que dans l'IS, excepté que les fibres de collagène semblent s'organiser de manière plus diffuse (Figure F-1). Le muscle PP possède un périmysium primaire très épais. Dans ce cas, l'orientation des fibres de collagène prend plusieurs directions au sein de la même trame,

figurant des feuillets alternant les orientations. En fonction de l'épaisseur, le nombre de feuillets distincts varie allant de un pour les trames peu épaisses à 3 pour les plus larges (Figure F-1).

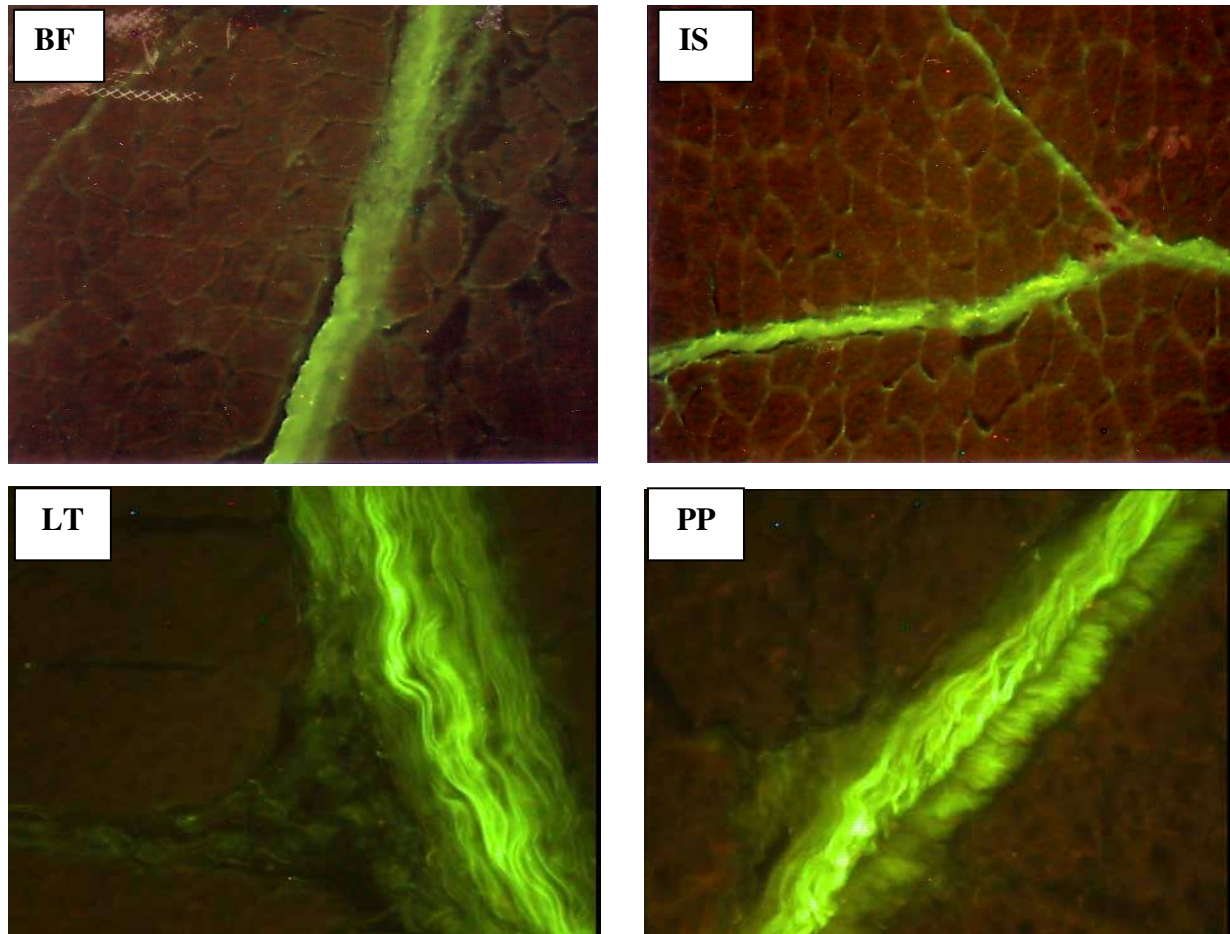


Figure F-1. Marquages immunologiques du collagène de type I au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins au grossissement 225 pour BF et IS et 450 pour LT et PP.

Cet empilement de couches de fibres de collagène a déjà été décrit (Nakamura *et al.*, 2003). Jarvinen *et al.* (2002) propose également que les fibres de collagène qui sont orientées transversalement par rapport au grand axe des fibres musculaires, et observées préférentiellement au centre de la trame de périmysium (Figure F-1), permettraient la liaison entre les faisceaux de fibres musculaires. Les couches périphériques, orientées longitudinalement, assureraient le glissement en translation entre les faisceaux, nécessaire lors des efforts et notamment lors de la contraction. En effet, le muscle PP subit beaucoup plus d'effort en cisaillement que le LT en raison de sa fonction anatomique.

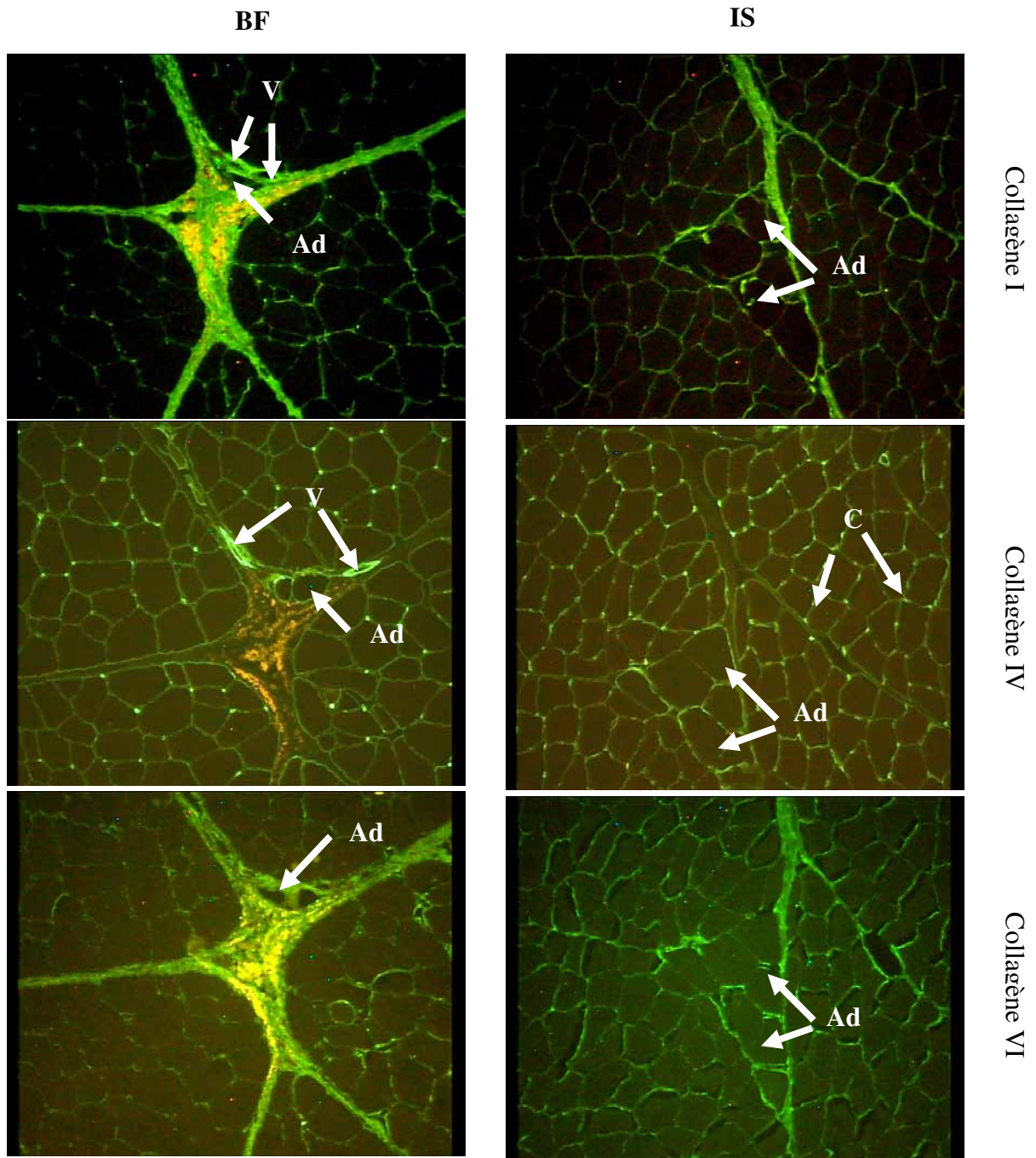


Figure F-2. Marquages immunologiques des collagènes de type I, IV et VI au FITC sur des coupes sériees de *Biceps femoris* (BF) et *Infraspinatus* (IS) au grossissement $\times 112$. AD pour adipocytes, C pour capillaires et V pour vaisseaux. L'élastine fluoresce naturellement en orange.

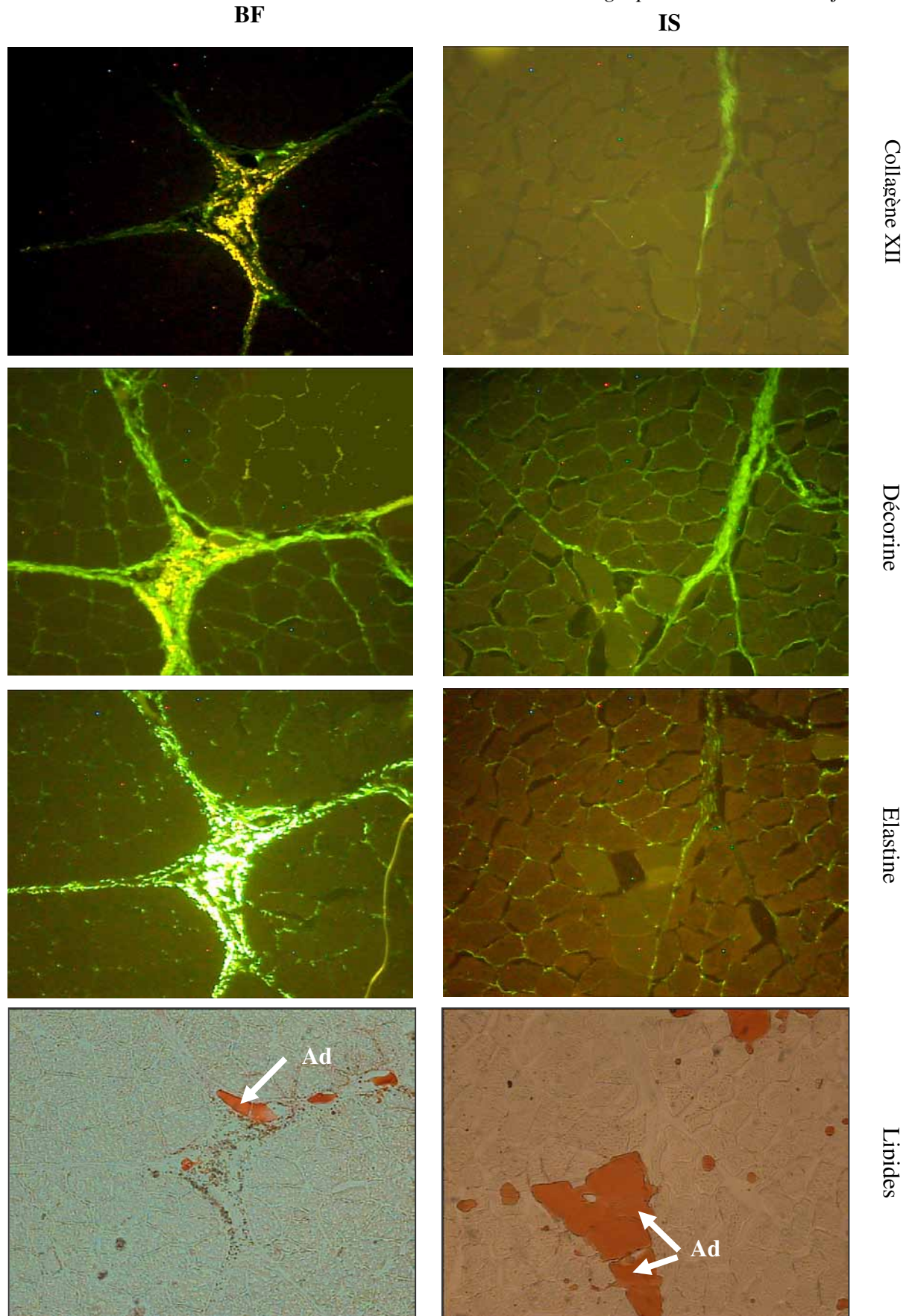


Figure F-3. Marquages immunologiques du collagène de type XII, de la décorine, de l'élastine et coloration des lipides au Huile rouge sur des coupes séries de *Biceps femoris* (BF) et *Infraspinatus* (IS) au grossissement $\times 112$. Ad pour adipocytes, C pour capillaires et V pour vaisseaux. L'élastine fluoresce naturellement en orange.

F.1.2 Collagène de type IV

La présence de collagène IV a été mise en évidence dans l'endomysium et les vaisseaux sanguins (V), notamment les capillaires (C), qui apparaissent sous la forme de points en périphérie des cellules musculaires, quelque soit le type de muscle, comme l'a déjà montré Nakajima *et al.* (Nakajima *et al.*, 1998). Il fait également partie de la lame basale qui entoure les adipocytes (Figure F-2).

F.1.3 Collagène de type VI

Le collagène VI est présent dans l'endomysium et le périmysium (Figure F-2) (Nakajima *et al.*, 1998). Il est présent notamment autour des adipocytes (Ad) (Figure F-2). En effet, le collagène VI sert de pont entre les cellules et les fibres de la matrice extracellulaire (van der Rest et Garrone, 1991).

F.1.4 Collagène de type XII

Le collagène XII est un composant mineur de la matrice extracellulaire musculaire, qui apparaît uniquement dans le périmysium chez le bovin (1999). Il n'est présent que dans les trames de périmysium suffisamment épaisses entourant les faisceaux secondaires de fibres musculaires (Figure F-4).

L'anticorps anti-collagène XII ne marque pas la paroi des adipocytes (Figure F-3)

Figure F-3. En revanche, le collagène apparaît souvent à proximité de ces derniers qui semblent avoir grossi en poussant les fibres de collagène comme observé dans le muscle IS (Figure F-4).

La comparaison des coupes sériées marquées contre les collagènes I et XII montre que le collagène de type XII semble se fixer spécifiquement sur certaines structures du collagène I, donnant un aspect discontinu au marquage dans le muscle BF (Figure F-5). Dans le LT également, seules certaines fibres semblent avoir fixé le collagène XII (Figure F-4). Dans le muscle PP, le marquage apparaît principalement sur certaines fibres de collagène I orientées

longitudinalement (par rapport au grand axe des fibres musculaires) en périphérie de la trame (Figure F-4). Le collagène XII faciliterait le glissement entre les fibres de collagène en diminuant l'interaction entre-elles (van der Rest M. et Dublet B., 1996). Ainsi le collagène XII en se fixant spécifiquement sur cette couche de fibres de collagène assurerait la possibilité de translation des faisceaux les uns par rapport aux autres lors de tension dans le muscle. En effet, le collagène XII est très souvent retrouvé à des endroits où s'exercent de fortes forces de tension (Koch *et al.* 1995)

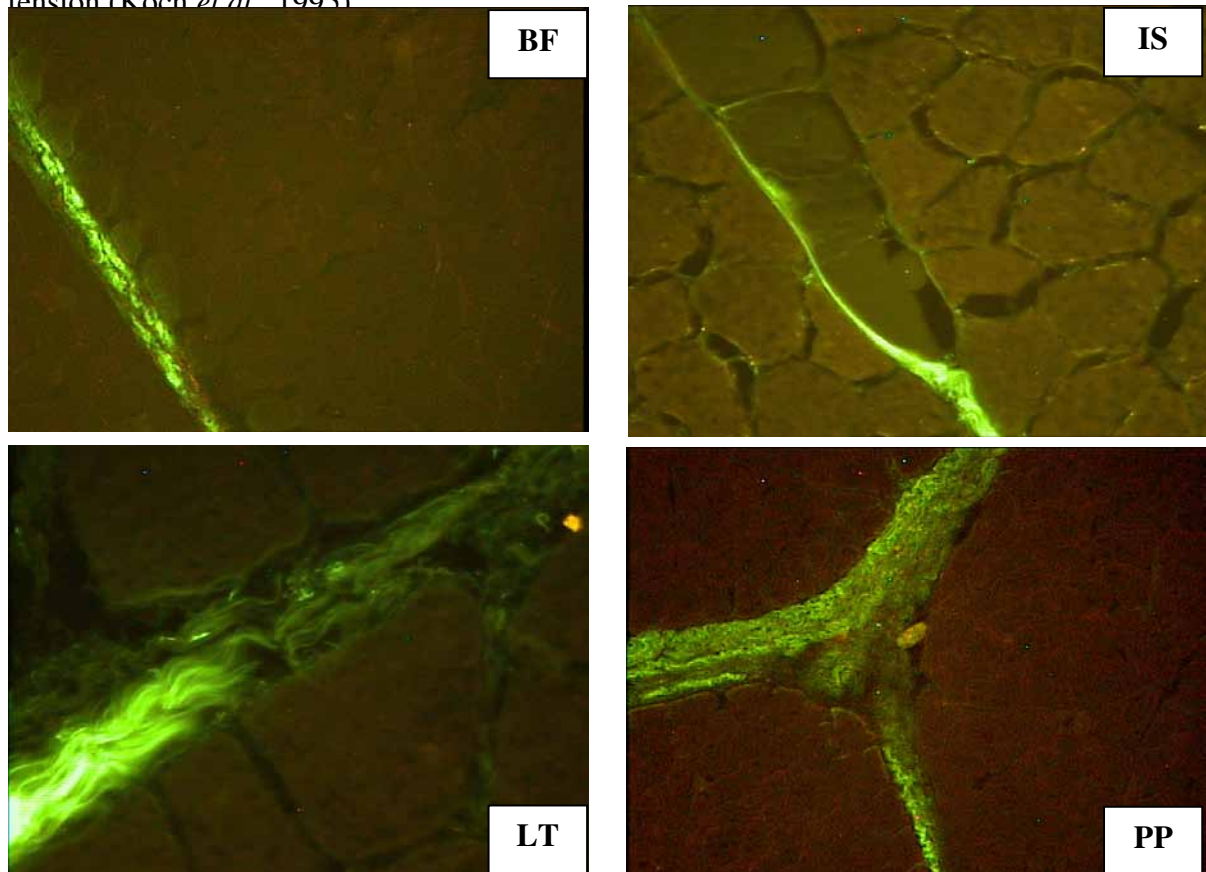


Figure F-4. Marquages immunologiques du collagène de type XII au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins (*Biceps femoris* (BF), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT) et *Pectoralis profundus* (PP) au grossissement $\times 450$

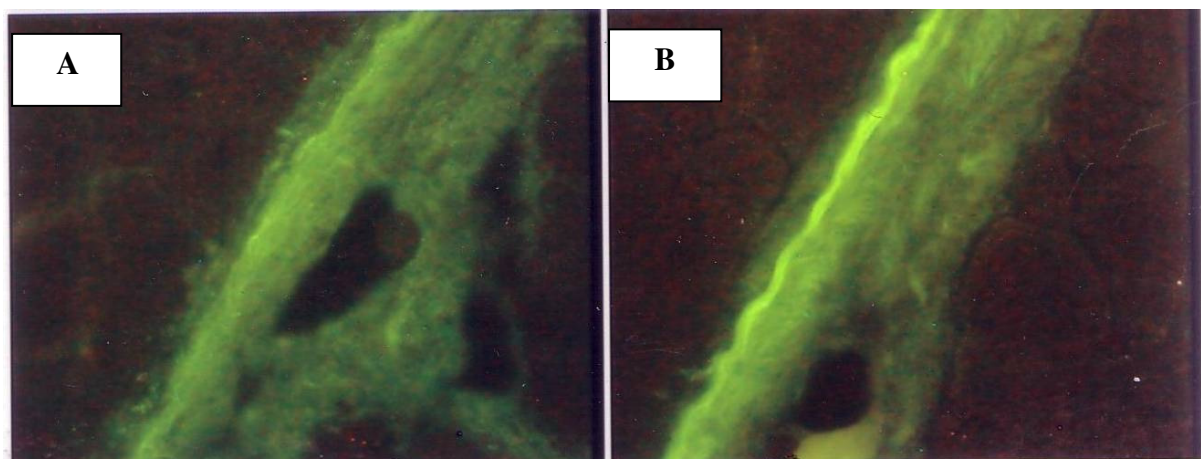


Figure F-5. Coupes histologiques sérieées de muscle *Pectoralis profundus* marquées avec un anticorps FITC contre le collagène de type I (A) et de type XII (B) au grossissement $\times 450$.

F.1.5 Collagène de type XIV

Le collagène de type XIV était présent dans le muscle en quantités très faibles (Figure F-6). Il a été difficile de mettre en évidence des différences entre muscles pour cette molécule minoritaire, qui n'a été mis en évidence que dans quelques trames de périmysium épaisses. Le collagène XIV est un collagène FACIT qui est associé aux fibres de collagène de type I (Nishiyama *et al.*, 1994). Cependant la Figure F-6 montre qu'il n'a été marqué que sur certaines fibres de collagène du périmysium. De plus, il est apparu près des adipocytes comme le collagène XII. En tant que collagène de type FACIT, il semble également jouer un rôle de lubrifiant dans la matrice extracellulaire en se fixant sur les fibres de collagène en périphérie des larges trames de périmysium.

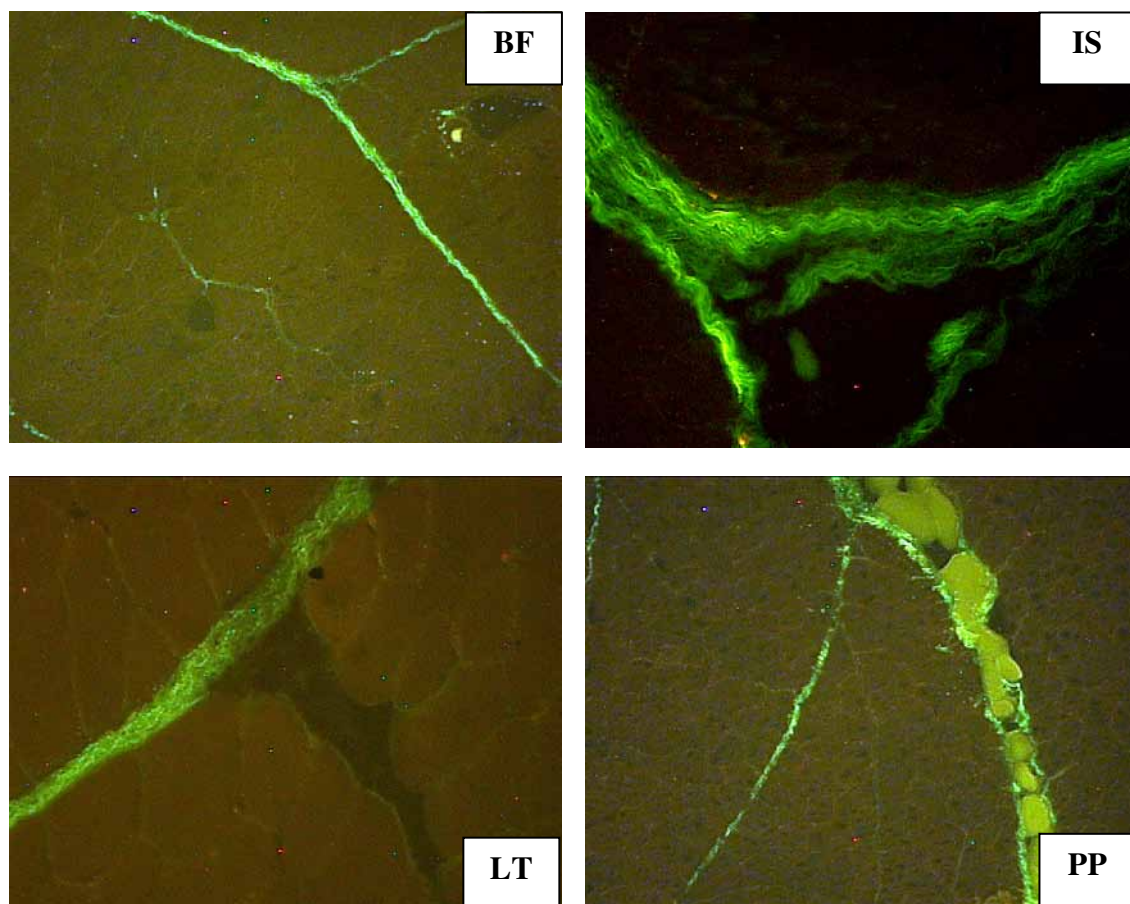


Figure F-6. Marquages immunologiques du collagène de type XIV au FITC sur des coupes transversales des quatre type de muscle bovin au grossissement $\times 450$ pour l'IS et 225 pour les BF, LT et PP.

F.1.6 Elastine

L'élastine a été retrouvée dans la paroi des vaisseaux sanguins (Figure F-3). Du fait de cette localisation particulière, les vaisseaux sanguins sont souvent utilisés comme témoin de marquage spécifique pour cette molécule. L'élastine a également été marquée dans le périmysium, notamment aux nœuds de jonction des faisceaux de fibres musculaires délimités par le périmysium primaire (Figure F-3), comme précédemment décrit par Rowe (Rowe, 1986). Le marquage ponctuel présent près des fibres musculaires semble co-localisé avec les capillaires sanguins. A plus fort grossissement, elle apparaissait sous forme de fibres dont l'orientation variait le long des faisceaux. L'élastine a également la propriété d'autofluorescer, c'est pour cela qu'elle est apparue en jaune sur les images dédiées aux autres marquages (Figure F-3).

Des différences en terme de quantité d'élastine ressortent très nettement entre muscle et entre animaux (Figure F-10 à F-13). En effet le muscle BF s'est distingué des trois autres par son intensité de marquage supérieure. Or les types de muscle de ce protocole ne sont pas connus pour leur forte quantité d'élastine. En effet d'après Bendall (Bendall, 1967) le muscle PP contient le plus d'élastine, les muscles BF et IS possèdent des quantités inférieures comparables et le muscle LT est le moins riche en élastine (Tableau A-3). La quantité d'élastine contenue dans le muscle IS doit être minorée. En effet, compte tenu de la quantité de collagène rapportée pour ce muscle, il semble que Bendall (Bendall, 1967) ait pris en compte l'aponévrose centrale du muscle dans son dosage. Il est donc logique de penser que la quantité d'élastine qu'il rapporte ne tient pas uniquement compte de l'élastine apporté par le périmysium. Par ailleurs, les différences entre nos observations et les valeurs de Bendall (Bendall, 1967) peuvent s'expliquer par la répartition très variable de l'élastine au sein même du muscle et par la taille réduite de notre échantillonnage.

F.1.7 Décorine

La décorine est présente à tous les niveaux de la matrice extracellulaire, aussi bien dans l'endomysium que dans les différents niveaux de périmysium (Figure F-3). Ceci est en accord avec son rôle supposé de molécule de remplissage de l'espace vide (Bailey et Light, 1989). Elle joue surtout un rôle dans la formation des fibrilles de collagène et dans la formation des liaisons de réticulation. De fait il est logique de la rencontrer partout où il y a du collagène. Elle est apparue également au niveau des adipocytes (Figure F-3).

Aucune différence importante entre les types de muscle n'est observée (Figure F-7). Cependant, il semblerait que le muscle LT comporte moins de décorine que les trois autres muscles (Figure F-7).

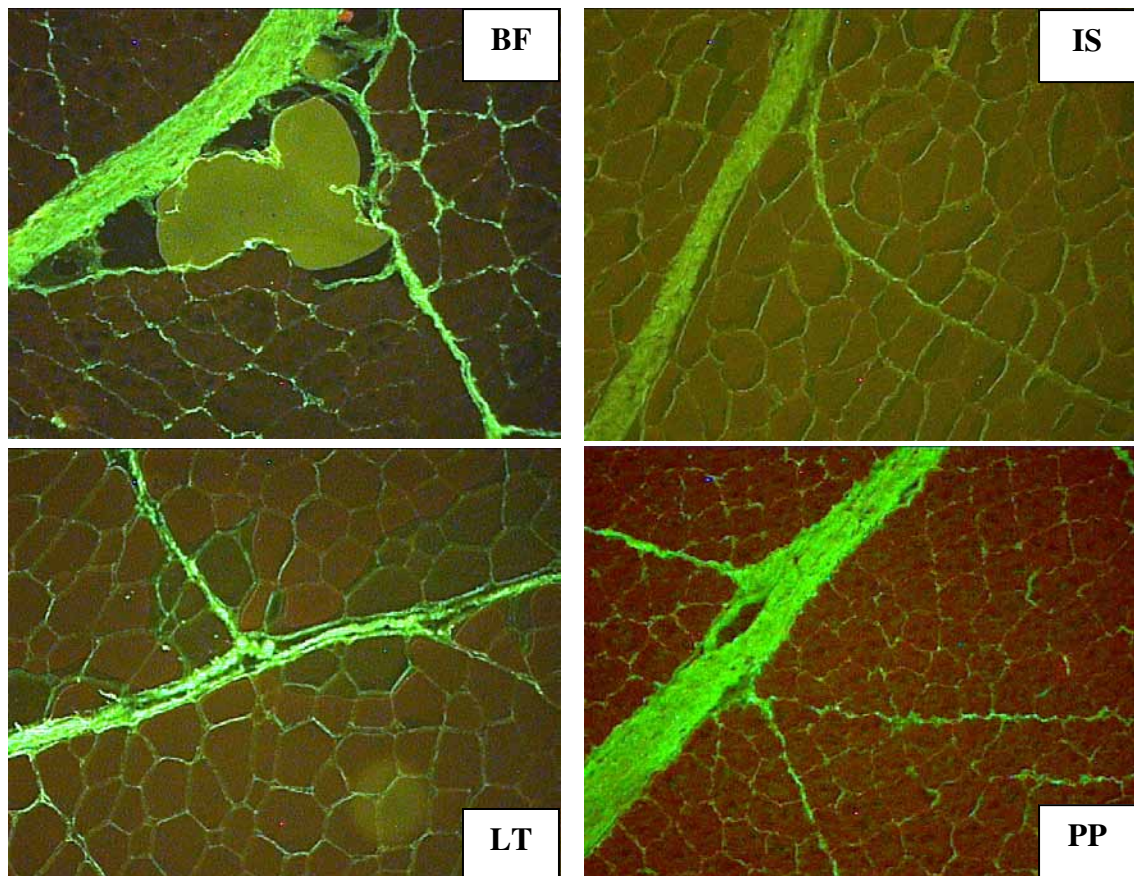


Figure F-7. Marquages immunologiques de la décorine au FITC sur des coupes transversales de muscles bovins (*Biceps femoris* (BF), *Infraspinatus* (IS), *Longissimus thoracis* (LT) et *Pectoralis profundus* (PP) au grossissement x 225

F.1.8 Lipides

Les adipocytes ont été observés majoritairement à proximité des vaisseaux sanguins comme l'ont précédemment décrit Nakajima *et al.* (1998) et Tume (2004). De plus ils apparaissaient principalement dans les trames délimitant les faisceaux d'ordre supérieur (Figure F-3). Le muscle IS, malgré ses trames fines présente un degré de persillé plus fort que les trois autres muscles ; c'est-à-dire que les lipides étaient insérés dans la plupart des segments de périnysium, quelle qu'ait été leur épaisseur (Figure F-8). Le muscle LT était beaucoup moins persillé, avec des adipocytes présents le long des trames de périnysium (Figure F-8). Les lipides dans le muscle BF, localisés principalement aux nœuds de périnysium, se présentaient sous la forme de triangles (Figure F-8). Enfin dans le muscle PP, les lipides apparaissaient exclusivement au niveau des nœuds (Figure F-8).

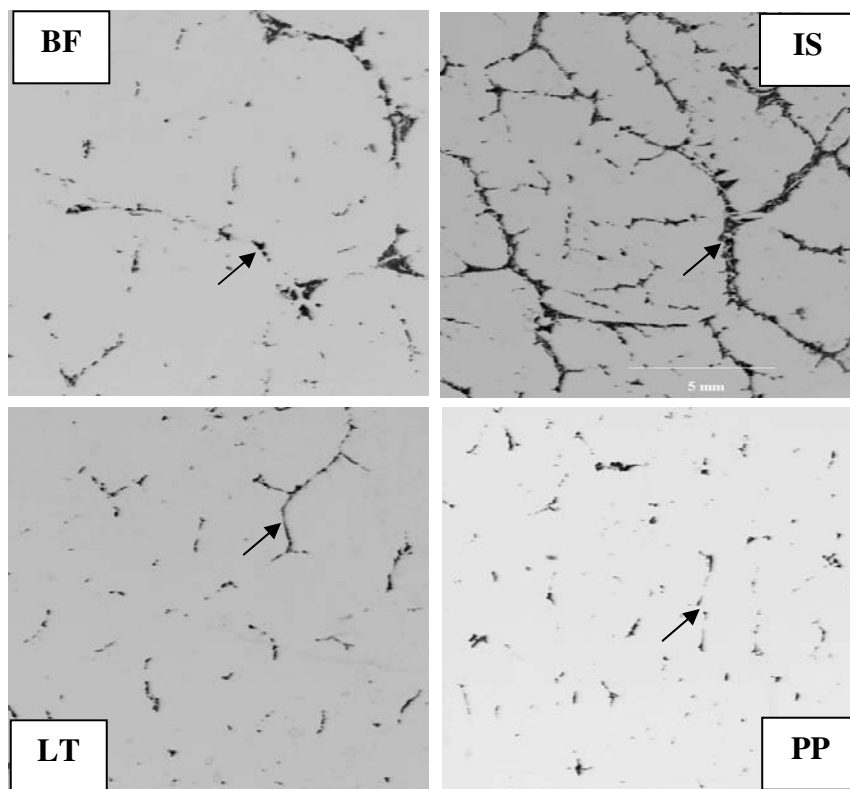


Figure F-8. Coupes transversales congelées de muscle colorées à l'huile rouge spécifique des lipides (ici en noir signalés par des flèches)

Comme décrit précédemment dans le plan de coupe (Figure F-8), les lipides ne sont également pas répartis de la même manière selon le type de muscle le long de l'axe des fibres musculaires. Ceci a été mis en évidence à l'aide d'une reconstruction isotrope en trois dimensions du tissu adipeux à partir des images acquise en RMN, grâce à une séquence spécifique des lipides (Figure F-9). Les muscles BF et PP présentaient un tissu adipeux filaire, les faisceaux de gras traversant l'échantillon de part en part. En revanche, le tissu adipeux des

muscles IS et LT, se présentait plutôt sous la forme de feuillets. Ceci peut être mis en correspondance avec les observations dans le plan. Ainsi les muscles où les adipocytes apparaissaient uniquement au niveau des nœuds (BF, PP) présentaient un tissu adipeux plutôt filaire, tandis que les muscles possédant des adipocytes le long des trames (IS, LT) présentaient un tissu adipeux sous la forme de feuillets.

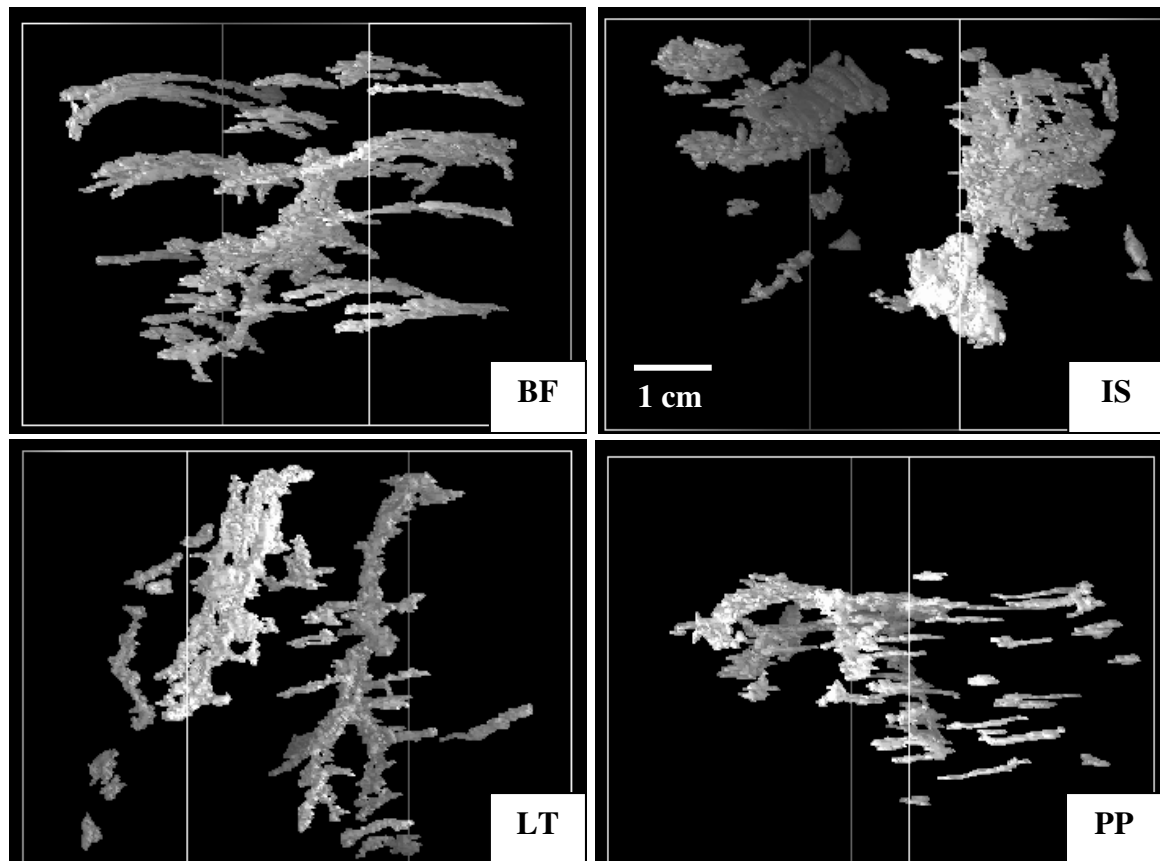


Figure F-9. Reconstruction tridimensionnelle isotrope du tissu adipeux à partir d'images RMN à l'aide d'une séquence CSSIR en mode « water saturated ».

Les observations précédentes ont permis de montrer que la présence de certaines molécules du tissu conjonctif varie selon le type de muscle. Les résultats suivants ne sont pas des quantifications (Tableau F-1), mais seulement des estimations par rapport à la présence ou non de fluorescence.

Tableau F-1. Présence des différents composés de la matrice extracellulaire selon le type de muscle. + peu présent, ++ assez présent, +++ très présent.

	BF	IS	LT	PP
Collagène I	++	+	+	++
Collagène IV	+	+	+	+
Collagène VI	+	+	+	+
Collagène XII	++	+++	++	+
Collagène XIV	+++	++	+	++
Elastine	+++	+	+	+
Décorine	++	+++	+	++
Lipides	+	+	+	+

Le collagène I, étant le composé majoritaire du tissu conjonctif, est présent de manière variable selon les types de muscles. Ces variations correspondent à celles de la quantité de collagène total, déjà détaillée chapitre E.2.1. En effet, la quantité de collagène total et surtout sa répartition spatiale dans le muscle influence la tendreté de la viande cuite. Les variations des autres constituants de la matrice extracellulaire ne peuvent, quant à eux, être reliées avec des variations de texture de la viande cuite.

Cependant d'autres observations ont pu être établies. Les quantités de collagènes de types IV et VI ne semblent pas varier en fonction du type de muscle. En effet, ces collagènes ont des rôles structuraux, car ils constituent la lame basale. Le collagène XII et la décorine semblent être plus présents dans le muscle IS que dans le muscle PP. Cette observation peut être reliée à la répartition des adipocytes. En effet, même si la quantité de lipides n'était pas significativement différente selon le type de muscle ($p > 0,05$), leur répartition était variable. Ainsi les muscles BF et PP ne possédaient de lipides qu'au niveau des nœuds de périnysium, sous la forme de faisceaux traversant l'échantillon de muscle. Par ailleurs, dans les muscles IS et LT, les lipides se situaient le long des trames de périnysium formant des feuillettes. La quantité de collagène XIV semble également varier selon le type de muscle. Cependant il s'agit d'un constituant très minoritaire et sa présence très limitée dans certains muscles, comme le LT, est principalement due à la teneur faible en collagène total de ce muscle. Enfin,

les variations de quantité d'élastine pourraient expliquer les variations du signal acquis en IRM par la méthode pondérée en susceptibilité, mise en œuvre pour localiser le tissu conjonctif non gras.

F.2 RELATION ENTRE LA COMPOSITION ET DEPOT LIPIDIQUE

Les marquages immunologiques ont suggéré une relation entre la présence de certains composés de la matrice extracellulaire et la disposition des adipocytes. Les types de collagène majoritaires (collagènes I, III) ne semblent pas varier en fonction de la présence des adipocytes. Par contre les composés minoritaires comme le collagène XII et la décorine semblent être reliés à la présence d'adipocytes. La quantité de marquage du collagène IV et VI ne semblent pas varier selon le type de muscle. Or on peut tout de même noter qu'ils apparaissent dans la membrane des adipocytes puisque ce sont des constituants de la lame basale.

Comme décrit précédemment, la présence du collagène XII varie selon les types de muscle et ce dernier n'était présent qu'au sein de certaines trames de périnysium primaire. Ce niveau hiérarchique est caractérisé par les trames les plus épaisses, où se logent préférentiellement les adipocytes. Le PP apparaît comme un muscle où les adipocytes se logent uniquement au niveau des noeuds et possède un marquage faible du collagène XII. A contrario, l'IS semble posséder une trame conjonctive favorisant le dépôt lipidique, comme le montre les épaisses marbrures réparties dans toutes les trames de ce muscle et présente un fort marquage du collagène XII même au sein des trames fines. Ces observations conduisent à penser que la présence de collagène XII favoriserait la présence des adipocytes. Cependant les quantités de lipides ne sont pas significativement différentes entre les muscles. Il semblerait donc que le collagène XII jouerait plus sur la répartition des adipocytes que sur la quantité de lipides stockés.

Or le rôle des collagènes FACIT, comme les collagène XII et XIV, serait de faciliter le glissement entre les fibres de collagène en diminuant l'interaction entre-elles, jouant de ce fait un rôle de lubrifiant (van der Rest et Dublet, 1996). De plus les adipocytes ont besoin d'une matrice extracellulaire plus flexible en tant que constituant du tissu adipeux, qui sert de tissu absorbeur de chocs et qui surtout constitue une réserve d'énergie imposant des changements de volume continuels. De plus il jouerait un rôle positif dans la différenciation des adipocytes (Tahara *et al.*, 2004).

Ce raisonnement reste tout de même à confirmer sur des effectifs d'échantillons plus importants et surtout grâce à une quantification objective à l'aide par exemple de Western blots.

En outre le muscle IS, dont les coupes histologiques montrent un degré important de persillé, a tendance à posséder plus de décorine que les autres muscles. Or Bailey et Light (1989) ont suggéré que le turn-over rapide des protéoglycannes devait être mis en relation avec une plus grande adaptabilité de la matrice extracellulaire aux changements de volume. La flexibilité de la matrice extracellulaire de ce type de muscle riche en décorine semble expliquer sa prédisposition à l'accumulation des adipocytes, malgré ses trames périnysiales fines.

En conclusion, la localisation des adipocytes dans le muscle est régie par de multiples facteurs. Elle est imposée par la structure du muscle, et notamment par l'épaisseur des trames périnysiales et la localisation des vaisseaux sanguins. La composition du tissu conjonctif joue également un rôle important ; notamment avec le collagène XII et de la décorine, qui favorisent le dépôt des lipides.

F.3 CONSEQUENCES SUR L'IMAGERIE IRM PONDÉREE EN SUSCEPTIBILITE

Une des modalités d'imagerie choisie pour caractériser l'organisation spatiale du tissu conjonctif a été l'imagerie RMN pondérée en susceptibilité (Bonny *et al.*, 2000). Or la comparaison des images acquises sur différents muscles a mis en évidence une différence de sensibilité de la méthode d'imagerie pour différentes natures de tissu conjonctif.

L'analyse des coupes histologiques a permis d'évaluer l'épaisseur du périnysium à des valeurs comprises entre 50 et 80 μm selon les types de muscles correspondant à ce qui a été rapportés par d'autres auteurs chez le bovin (Brooks et Savell, 2004 ; Torrescano *et al.*, 2001). Or le volume du voxel lors de nos acquisitions IRM par la méthode pondérée en susceptibilité était de $100 \times 100 \times 500 \mu\text{m}^3$. Ainsi l'épaisseur des structures observées était bien inférieure à la taille d'un des côtés du voxel. Toutefois en raison des perturbations magnétiques qu'elles génèrent, l'imagerie pondérée en susceptibilité permet de détecter des insertions de volume bien inférieur à celui du voxel, pour autant qu'il induise des variations de champ suffisantes.

Or avec des épaisseurs de réseaux comparables le tissu conjonctif des muscles BF et PP induisent des signaux très différents (Figure F-10 et F-13). Cela indique donc que l'épaisseur n'est pas le seul facteur influençant la variation des signaux et que la composition du tissu conjonctif joue un rôle qu'il est nécessaire de caractériser. Il est déjà connu que les lipides du

tissu conjonctif génèrent un fort hyposignal sur les images pondérées en susceptibilité. Cependant les différences entre les muscles BF et PP ont été aussi observées dans des zones dépourvues de gras. Ainsi il est apparu nécessaire d'étudier le rôle spécifique de chacun des candidats probables (types particuliers de collagène, élastine, décorine).

La stratégie a consisté à effectuer des acquisitions sur un même échantillon d'une part en imagerie RMN pondérée en susceptibilité et d'autre part en histologie où les potentiels candidats potentiels ont été marqués grâce à des anticorps spécifiques. La décorine a pu être éliminée rapidement car elle apparaît dans toutes les trames de tissu conjonctif de l'endomysium et du périmysium (Figure F-3). On a également vu précédemment que les collagènes de types III, IV, VI, XII et XIV étaient en quantité très négligeable au sein des coupes et ne pouvaient pas être à l'origine de cette modification de la susceptibilité magnétique du tissu conjonctif. Il restait donc le collagène I, collagène majoritaire et l'élastine. Les Figure F-10 à F-13 présentent des acquisitions sur une même zone en IRM, en histologie après coloration au Rouge Sirius mettant en évidence les fibres conjonctives (collagène et élastine) et après les marquages du collagène I et l'élastine, selon le plan ci-après.

Les muscles IS et LT ont conduit à des images RMN peu contrastées (Figure F-11 et Figure F-12), malgré la présence de collagène I. Par contre, les coupes marquées contre l'élastine n'ont pas permis de mettre en évidence cette protéine. Les muscles BF et PP, dont l'épaisseur du périmysium est comparable, produisent des signaux en IRM très différents. En effet les images du muscle BF permettent de discerner très distinctement les faisceaux de fibres musculaires (Figure F-10) alors que les images du muscle PP ne montrent que des signaux ponctuels à l'emplacement des nœuds de périmysium (Figure F-13). Or le muscle BF présente un fort marquage de l'élastine contrairement au muscle PP. En conclusion, l'élastine semble être la protéine du tissu conjonctif, prépondérante dans la génération du signal pondérée en susceptibilité.

IRM	Elastine
Collagène I	Rouge Sirius

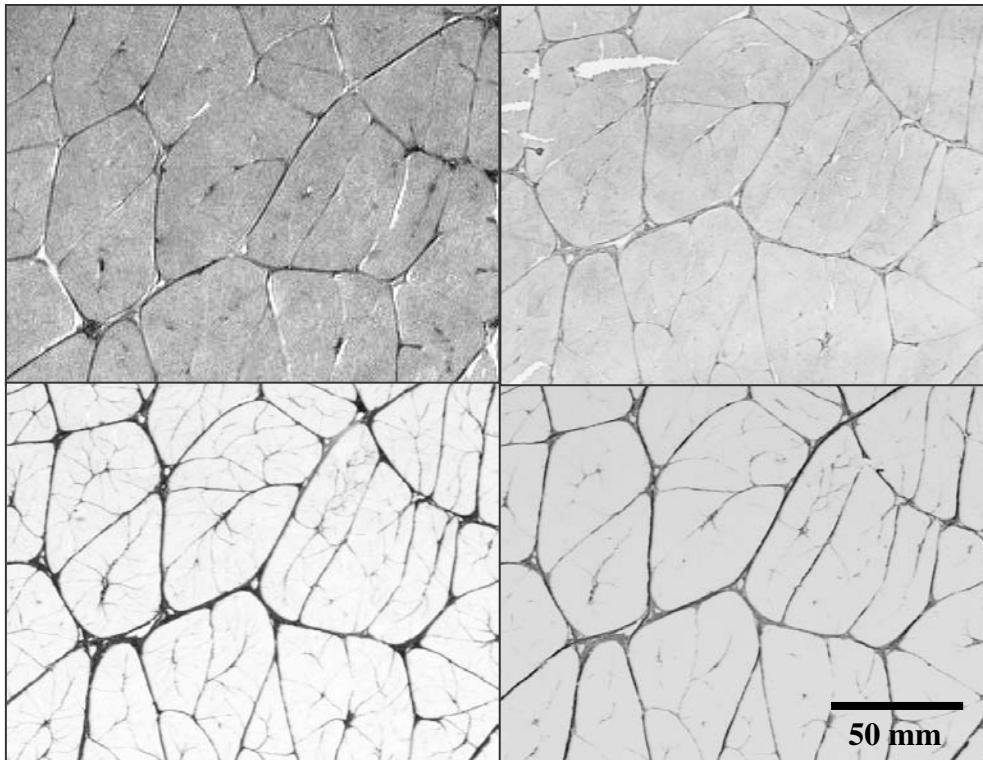


Figure F-10. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de *Biceps femoris* (BF) en imagerie RMN, et trois coupes sériées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.

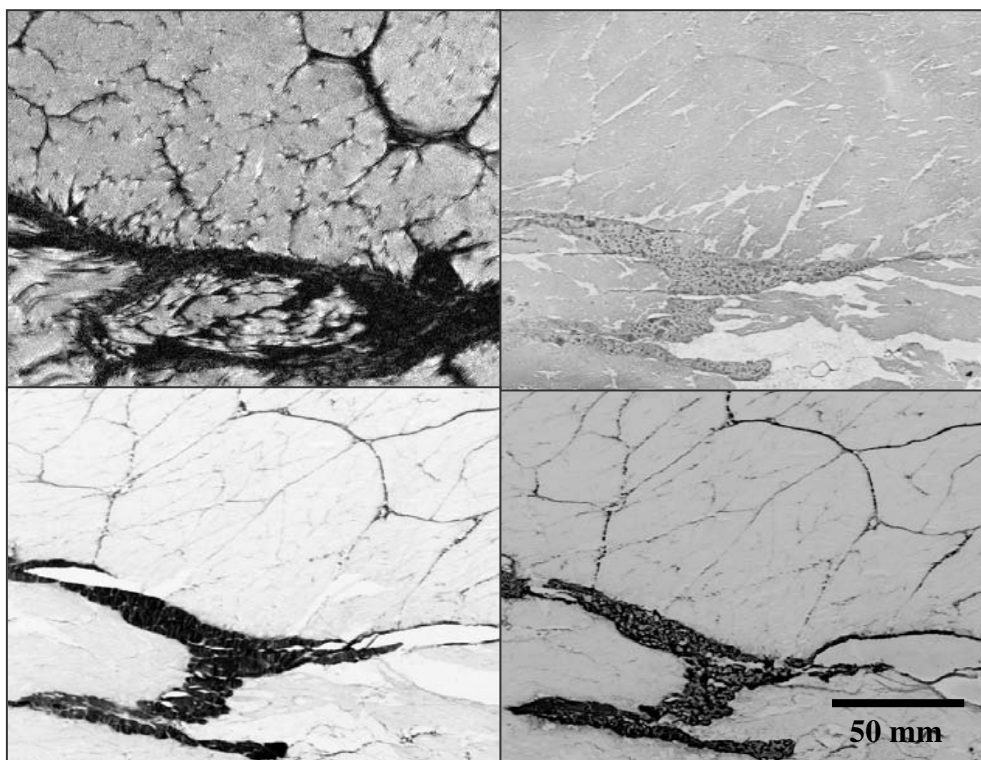


Figure F-11. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon d'*Infraspinatus* (IS) en imagerie RMN, et trois coupes sériées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.

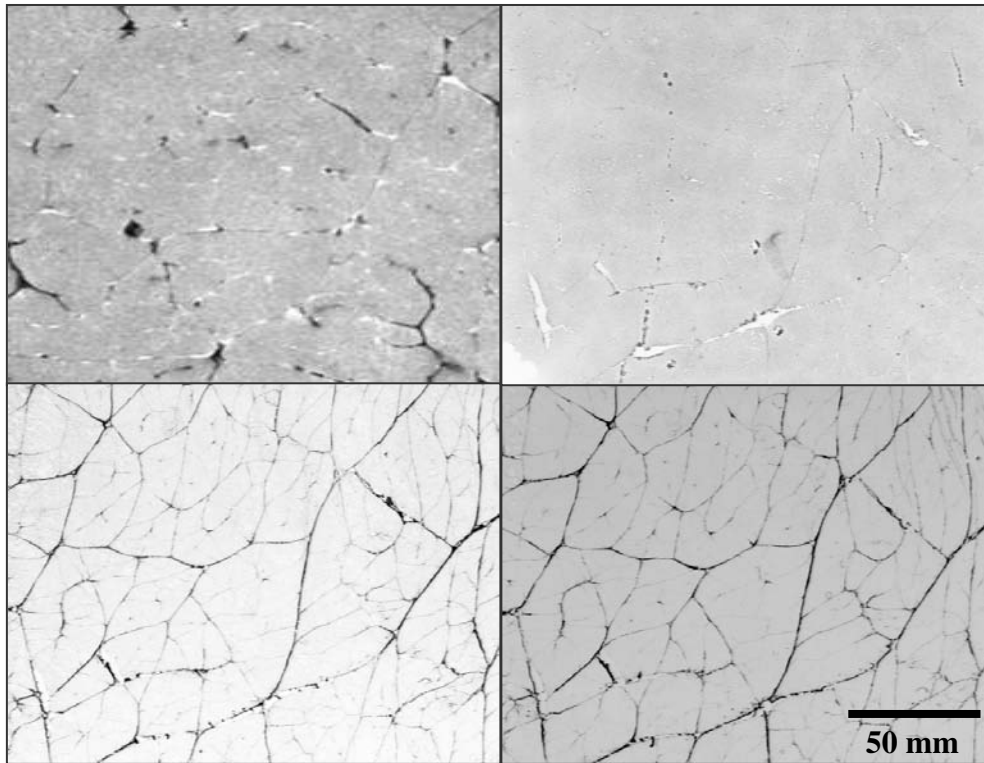


Figure F-12. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de *Longissimus thoracis* (LT) en imagerie RMN, et trois coupes sériées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.

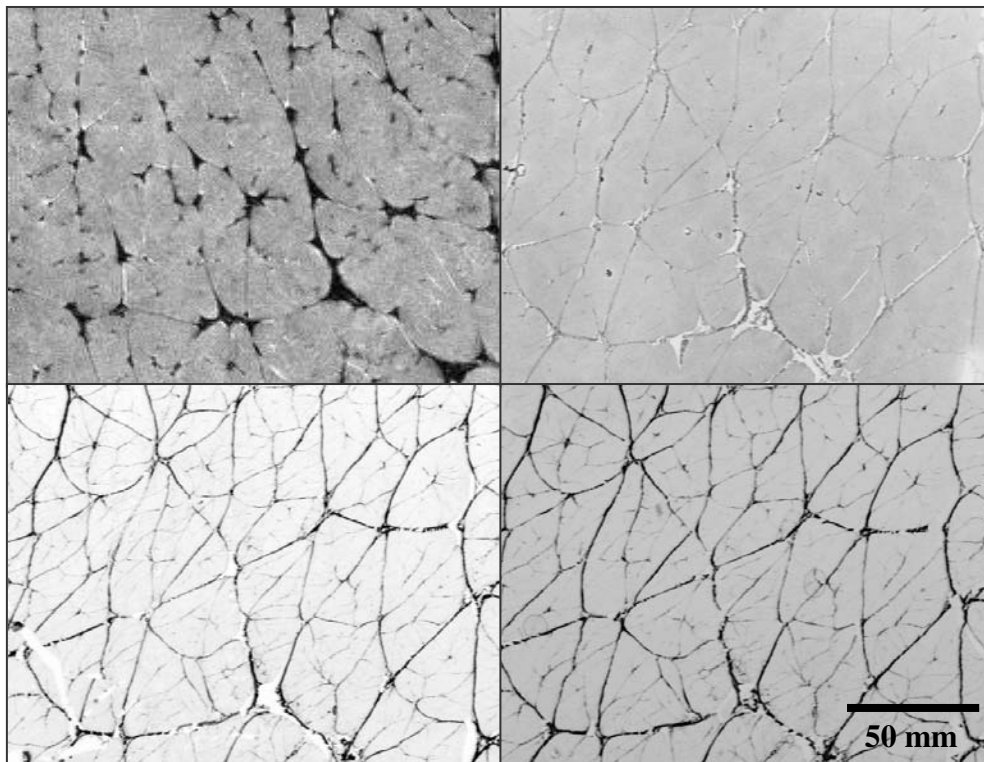


Figure F-13. Comparaison entre l'acquisition d'un même échantillon de *Pectoralis profundus* (PP) en imagerie RMN, et trois coupes sériées de la même zone marquée spécifiquement contre l'élastine, le collagène I et colorée au Rouge Sirius.

F.4 CONCLUSION

Afin de compléter la caractérisation de l'organisation du tissu conjonctif, la répartition des différents composants de celui-ci a été observée. Elle semble être peu reliée aux variations de texture. Cependant, elle possède une influence sur d'autres caractéristiques du muscle comme notamment la répartition du gras. Elle joue également sur la qualité de l'imagerie RMN. L'élastine s'est révélée comme une protéine-clef à l'origine du signal en imagerie pondérée par susceptibilité, ouvrant notamment de nombreuses perspectives quant à l'imagerie des tissus riches en élastine, comme le muscle cardiaque ou encore les vaisseaux sanguins.

CONCLUSION

Depuis longtemps, les bouchers considèrent le grain de la viande, c'est-à-dire l'organisation du tissu conjonctif intramusculaire visible à l'échelle macroscopique, comme un indicateur de la tendreté de la viande bovine. Nous avons cherché à valider ce savoir empirique par des méthodes objectives, en examinant les liens existant entre l'organisation spatiale du tissu conjonctif et la tendreté de la viande.

Par analyse d'images histologiques et d'images RMN nous avons caractérisé cette structure à l'aide de paramètres quantitatifs que nous avons reliés à la texture de la viande, pour extraire des marqueurs de la structure musculaire. Nos résultats ont démontré qu'il s'agissait d'une problématique multi-échelle requérant une vision multi-modale. En effet, le tissu conjonctif est structuré en plusieurs niveaux imbriqués influençant chacun à des degrés différents la texture de la viande. Il est apparu que les structures macroscopiques, visualisées grâce à l'IRM, jouent un rôle majeur sur la tendreté de la viande bovine maturée. En effet, plus un muscle possède de faisceaux de fibres musculaires dont le rayon est compris entre 0,7 et 1,2 mm, plus il est dur.

Ce travail, complété par une caractérisation immunohistologique du tissu conjonctif, a également permis d'établir des hypothèses sur l'existence d'une relation entre la répartition du dépôt de gras dans le muscle et la présence ou non de certains constituants du tissu conjonctif. Ainsi le collagène de type XII, principalement, semble favoriser le dépôt des lipides sous la forme de feuillet dans des muscles, comme l'*Infraspinatus* et le *Longissimus thoracis*. De plus, l'élastine a pu être identifiée comme génératrice principale du signal observée en IRM par la méthode pondérée en susceptibilité magnétique.

Les résultats obtenus ouvrent deux types de perspectives, les premières, «fondamentales» qui trouveront leur application dans le domaine de la recherche, les secondes qui ouvrent des voies d'application dans la filière viande.

Pour réaliser cette étude, nous avons mis au point un outil d'analyse d'images permettant de segmenter et de quantifier de manière automatique et validée le tissu conjonctif intramusculaire, grâce à la construction de cartes de référence. Si des méthodes plus performantes sont sans doute applicables à nos images, ce travail souligne l'intérêt essentiel de disposer de moyens de validation et d'optimisation, comme les cartes de référence. La construction de cartes de référence constitue une méthode générique, qui peut être adaptée à tout type d'imagerie et à toute méthode de segmentation, permettant ainsi de créer une banque d'images étalons, garantissant la calibration de tout outil d'analyse d'images.

L'environnement de l'unité de recherche, dans lequel a été réalisée cette thèse, est propice à l'acquisition d'images multimodales du muscle. En conséquence, la construction d'une banque de cartes de référence, couvrant tout le spectre des imageries disponibles, s'impose.

Enfin il faut noter que notre étude s'est limitée à une caractérisation bidimensionnelle de l'organisation spatiale du tissu conjonctif. Or le muscle est un objet volumique et dynamique, pour lequel il serait utile d'intégrer la troisième dimension de l'espace et éventuellement le temps de maturation, grâce notamment à l'imagerie RMN. Ceci permettrait de prendre en compte la variation intra muscle et le traitement technologique des carcasses (maturation, cuisson). Comprendre le comportement, dans l'espace et au cours de la maturation, des structures qui influencent la texture devrait ainsi permettre de construire un modèle simulant la résistance mécanique du matériau « viande », à l'aide d'outils mathématiques de modélisation couramment appliqués pour l'étude de la résistance des matériaux.

Le rôle prépondérant des structures macroscopiques ouvre des perspectives vers la mise au point de méthodes de caractérisation, pouvant servir d'outil de prédiction de la tendreté de la viande bovine. En effet, des méthodes basées sur de l'imagerie macroscopique de tranches de viande, devraient pouvoir être utilisées en ligne dans l'optique de garantir la qualité de la viande commercialisée et de mieux valoriser certains morceaux jusqu'alors injustement dépréciés, pour autant que les conditions optimales de maturation de la carcasse soient remplies.

Il faut cependant insister sur le fait que cette étude a été conduite sur un modèle expérimental reposant sur la variabilité inter muscle, générant ainsi une large gamme de variations de structure du réseau conjonctif et de tendreté. Nos résultats doivent, donc, être confirmés sur des variations plus fines, induites en particulier par le type d'animal pour un muscle donné, qui correspondent à l'une des problématiques majeures rencontrées par la filière bovine.

De plus, les relations entre paramètres structuraux du réseau conjonctif et tendreté de la viande ont été établies dans le cadre d'un barème de cuisson limité à une certaine catégorie de muscles (potentiellement tendres donc à cuisson rapide ou en rôti). Il est, de fait, nécessaire d'envisager l'application de nos travaux à d'autres types de muscle préparés dans d'autres conditions de cuisson. Ceci pourrait d'ailleurs être conduit en parallèle avec l'étude d'autres caractéristiques de texture, comme la jutosité. Cet descripteur bien que moins important que la tendreté dans le cas de la viande bovine, joue cependant un rôle majeur pour les viandes porcines et de volailles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abouelkaram, S., Suchorski, K., Buquet, B., Berge, P., Culioli, J., Delachartre, P. et Basset, O., 2000. Effects of muscle texture on ultrasonic measurements. *Food Chem.*, 69, 447-455.
- Abustam, E., Bordes, P. et Culioli, J., 1987. Relationships between mechanical properties of raw meat and characteristics of connective tissue. *Proceeding of the 3rd ICoMST*, Helsinki, Finlande, 4, 163-165.
- Bailey, A. J., 1972. The basis of meat texture. *J. Sci. Food Agric.*, 23, 995-1007.
- Bailey, A. J. et Light, N. D, 1989. Connective tissue in meat and meat products. Elsevier applied science Eds, Londres.
- Bailey, A. J., Restall, D. J., Sims, T. J. et Duance, V. J., 1979. Meat tenderness: immunofluorescent localisation of the isomorphic forms of collagen in bovine muscles of varying texture. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 203-210.
- Bancroft, J. D. et Stevens, A., 1990. Theory and practice of histological techniques – 3^{ème} édition, Churchill Livingstone Eds, Londres.
- Baradez, M. O., McGuckin, C. P., Forraz, N., Pettengell, R. et Hoppe, A., 2004. Robust and automated unimodal histogram thresholding and potential applications. *Pattern Recogn*, 37, 1131-1148.
- Basset, O., Buquet, B., Abouelkaram, S., Delachartre, P. et Culioli, J., 2000. Application of texture image analysis for the classification of bovine meat. *Food Chem.*, 69, 437-445.
- Beisner, H. M., 1968. A recursive Bayesian approach to pattern recognition. *Pattern Recogn*, 1, 13-31.
- Belew, J. B., Brooks, J. C., McKenna, D. R. et Savell, J. W., 2003. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Sci.*, 64, 507-512.
- Bendall, J. R., 1967. The elastin content in various muscles of beef animals. *J. Sci. Food Agric.*, 18, 553-558.
- Berge, P., Kuypers, R. et Kurth, L. B., 1997. Collagen crosslink profile and meat texture in two beef muscles. *Proceeding of the 43rd ICoMST.*, Auckland, Nouvelle Zélande, 548-549.
- Berge, P., Labas, R., Jurie C., Dubroeuq H., Taylor, R. et Listrat A., 2001. Muscle structure and meat quality as affected by carcass muscle yield in two beef breeds. *Proceeding of the 47th ICoMST.*, Crakovie, Pologne.
- Bergman, I. et Loxley, R., 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Ana. Chem.*, 35, 1961-1965.

Bezdek, J. C., 1981. Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms. Plenum Press Eds, New York.

Bidanset, D., Guidry, C., Rosenberg, L., Choi, H., Timpl, R. et Hook, M., 1992. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J. Biol. Chem.*, 267, 5250-5256.

Boccard, R., Naudé, R. T., Cronje, D. E., Smit, M. C., Venter, K. et Rossow, E., 1979. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Sci.*, 3, 261-281.

Bonnet, M. et Kopp, J., 1986. Dosage du collagène dans les tissus conjonctifs, la viande et les produits carnés. *Viandes et Produits Carnés*, 7, 263-266.

Bonny, J. M., Laurent, W., Labas, R., Taylor, R., Berge, P. et Renou, J. P., 2000. Magnetic resonance imaging of connective tissue : a non-destructive method for characterizing muscle structure. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 337-341.

Bouton, P. E., Ford, A. L., Harris, P. V. et Ratcliff, D., 1975. Objective-subjective assessment of meat tenderness. *J. Text. Studies*, 6, 315-328.

Bouton, P. E. et Harris, P. V., 1972. A comparison of some objective methods used to assess meat tenderness. *J. Food Sci.*, 37, 218-221.

Brady, D. E., 1937. A study of the factors influencing tenderness and texture of beef. *Proc. Amer. Soc. Animal Production*, 30, 246-250.

Brooks, J. C. et Savell, J. W., 2004. Perimysium thickness as an indicator of beef tenderness. *Meat Sci.*, 67, 329-334.

Browning, M. A., Huffman, D. L., Egbert, W. R. et Jungst, S. B., 1990. Physical and compositional characteristics of beef carcasses selected for leanness. *J. Food Sci.*, 55, 9-14.

Burson, D. E. et Hunt, M. C., 1986. Heat-induced changes in the proportion of types I and III collagen in bovine *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.*, 17, 153-160.

Cannell, R. C., Tatum, J. D., Belk, K. E., Wise, J. W., Clayton, R. P., et Smith, G. C., 1999. Dual component video image analysis system (VIASCAN) as a predictor of beef carcass red meat yield percentage and for augmenting applicatoin of USDA yield grades. *J. Anim. Sci.*, 77, 2942-2950.

Canny, J., 1986. A computational approach to edge detection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 8, 679-698.

Carmack, C. F., Kastner, C. L., Dikeman, M. E., Schwenke, J. R. et Garcia Zepeda, C. M., 1995. Sensory evaluation of beef-flavor-intensity, tenderness, and juiciness among major muscles. *Meat Sci.*, 39, 143-147.

- Clarke, L. P., Velthuisen, R. P., Phuphanich, S., Schellenberg, J. D., Arrington, J. A., et Silbiger, M., 1993. MRI: stability of three supervised segmentation techniques. *Magn Reson Imaging*, 11, 95-106.
- Collewet G., Bogner P., Allen P., Busk H., Dobrowolski A., Olsen E., Davenel A., 2005. Determination of the lean meat percentage of pig carcasses using magnetic resonance imaging. *Meat Sci.*, in press.
- Cooper, C. C., Breidenstein, B. B., Cassens, R. G., Evans, G. et Bray, R. W., 1968. Influence of marbling and maturity on the palatability of beef muscle : histological considerations. *J. Anim. Sci*, 27, 1542-1546.
- Cross, H. R., Carpenter, Z. L., et Smith, G. C., 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *J. Food Sci.* , 38, 998-1001.
- Cross, H. R., West R.L, et Dutson T.R, 1981. Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef *Semitendinosus* muscle. *Meat Sci.*, 5, 261-266.
- Denoyelle, C. et Lebihan, E., 2004. Intramuscular variation in beef tenderness. *Meat Sci.*, 66, 241-247.
- Dougherty, E. R. et Pelz, J. B., 1981. Morphological granulometric analysis of electrophotographic images - size distribution statistics for process control. *Opt.eng*, 30, 438-444.
- Dransfield, E., 1977. Intramuscular composition and texture of beef muscles. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 833-842.
- Dransfield, E., Martin, J. F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C. et Picard, B., 2003. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science*, 76: 387-399.
- Du, C. J et Sun, D. W, 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Sci. Technol.*, 15, 230-249.
- Dumont, B. L., La structure des muscles. 1986, ERTI Eds, Paris, 43-51.
- Dumont, B. L. et Schmitt O, 1973. Conséquences de l'hypertrophie musculaire héréditaire sur la trame conjonctive du muscle de bovin. *Ann Genet Sel anim*, 5, 499-506.
- Eggen, K. H., Ekhold, W. E., Host, V. et Kolset, S. O., 1998. Proteoglycans and meat quality- A possible role of chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan in postmortem degradation. *Basic Appl. Myol.*, 8, 159-168.
- Eggen, K. H. et Ekholdt, W. E., 1995. Degradation of decorine in bovine *M.Semimembranosus* during *postmortem* storage. *ICOMST*, San Antonio, USA, 6, 662-663.

- Fang, S. H., Nishimura, T. et Takahashi, K., 1999. Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *J. Anim. Sci.*, 77, 120-130.
- Faucitano, L., Huff, P., Teuscher, F., Gariepy, C. et Wegner, J., 2005. Application of computer image analysis to measure pork marbling characteristics. *Meat Sci.*, 69, 537-543.
- Fichard, A., Kleman, J. P., et Ruggiero, F., 1995. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol*, 14, 515-31.
- Flint, F. O. et Pickering, K., 1984. Demonstration of collagen in meat products by an improved picro-sirius red polarisation method. *Analyst*, 109, 1505.
- Galland, F., Bertaux, N. et Réfrégier, P., 2003. Segmentation d'image par minimisation de la complexité stochastique. *Proceeding of MAJECSTIC*.
- Galloway, M. M., 1975. Texture analysis using grey level run lengths. *Comput. Graph. Image Proc*, 4, 172-179.
- Geesink G.H., Koolmees P.A., Van Laack H.L.J.M. et Smulders F.J.M., 1995. Determinants of tenderisation in beef *Longissimus dorsi* and *Triceps brachii* muscles. *Meat Sci.*, 41, 7-17.
- Glasbey, C. A., 1993. An Analysis of Histogram-Based Thresholding Algorithms. *Graph. Mod. Image Proc.*, 55, 532-537.
- Goll, D. E., Robson, R. M. et Stromer, M. H., Skeletal muscle, nervous system, temperature regulation, and special senses. 1984.
- Greaser, M. L., 1997. Postmortem changes in muscle extracellular matrix proteins. *Reciproc. Meat Conf. Proc.*, 50, 53-59.
- Hammond, J., 1932, Growth and the development of mutton qualities in the sheep. In Hammond, J Ed, Biological Monographs and Manuals, vol X, Londres.
- Haralick, R. M., 1975. The pattern discrimination problem from the perspective of relation theory. *Pattern Recog.*, 7, 67-79.
- Haralick, R. M., Shanmugam, K. et Dinstein, I., 1973. Textural features for image classification. *IEEE Trans. Systems Man Cybernet.*, SMC-3, 610-621.
- Haralick, R. M., 1984. Digital step edges from zero crossings of second directional derivatives. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, PAMI-6, 58-68.
- Harries, J., Rhodes, D. N. et Chrystall, B. B., 1972. Meat texture I. Subjective assessment of the texture of cooked beef. *J. Text. Studies*, 3, 101.
- Harris, J. J., Miller, R. K., Savell, J. W., Cross, H. R. et Ringer, L. J., 1992. Evaluation of the tenderness of beef top sirloin steaks. *J. Food Sci.*, 57, 6-10.

Harris, P. V. et Shorthose, W. R., 1988, Meat texture. In Lawrie R. Ed, Developments in meat science, 4, 245-296, Elsevier applied science, London, 4, 245-296.

Herring, H. K., Cassens, R. G. et Briskey, E. J., 1967a. Factors affecting collagen solubility in bovine muscles. *J. Food Sci.*, 32, 534-538.

Herring, H. K., Cassens, R. G., Suess, C. C., Brungardt, V. H. et Briskey, E. J., 1967b. Further studies on bovine muscle tenderness as influenced by carcass position, sarcomere length, and fibre diameter. *J. Food Sci.*, 30, 1049-1054.

Herring, H. K., Cassens, R. G., Suess, C. C., Brungardt, V. H., et Briskey, E. J., 1967c. Tenderness and associated characteristics of stretched and contracted bovine muscles. *J. Food Sci.*, 32, 317-323.

Jarvinen, T. A., Jozsa, L., Kannus, P., Jarvinen, T. L. et Jarvinen, M., 2002. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil*, 23, 245-54.

Jeremiah, L. E. et Martin, A. H., 1981. Intramuscular collagen content and solubility: their relationship to tenderness and alteration by postmortem aging. *Can. J. Anim. Sci.*, 61, 53-61.

Jeremiah, L. E., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L. et Gibson, L. L., 2003a. Assessment of the chemical and cooking properties of the major beef muscles and muscle groups. *Meat Sci.*, 65, 985-992.

Jeremiah, L. E., Gibson, L. L., Aalhus, J. L. et Dugan, M. E. R., 2003b. Assessment of palatability attributes of the major beef muscles. *Meat Sci.*, 65, 949-958.

Kaldoudi, E. et Williams, S., 1992. Fat and water differentiation by nuclear magnetic resonance imaging. *Concepts in Magnetic Resonance*, 4, 162-165.

Kamoun, M. et Culioli, J., 1989. Influence of ageing on the mechanical properties of bovine cooked meat. *Sci. Aliments*, 9, 3-18.

Karnuah, A. B., Moriya, K., Nakanishi, N., Nade, T., Mitsuhashi, T. et Sasaki, Y., 2001. Computer image analysis for prediction of carcass composition from cross-sections of Japanese Black steers. *J. Anim Sci.*, 79, 2851-2856.

Kass, M., Witkin, A. et Terzopoulos, D., 1987. Snakes: Active Contour Models. *Int J. Computer Vision*, 1, 321-331.

Kim, N., Amin, V., Wilson, D., Rouse, G. et Udpa, S., 1998. Ultrasound image texture analysis for characterizing intramuscular fat content of live beef cattle. *Ultrason Imaging*, 20, 191-205.

- Koch, M., Bohrmann, B., Matthison, M., Hagios, C., Trueb, B. et Chiquet, M., 1995. Large and small splice variants of collagen XII: differential expression and ligand binding. *J. Cell Biol.*, 130, 1005-1014.
- Kopp, J. et Bonnet, M., 1982. Qualité des viandes de taurillons: évolution avec l'âge des caractéristiques physico-chimiques des muscles - Le tissu conjonctif musculaire. *Bull. Tech. CRZV Theix, INRA*, 48, 34-37.
- Kuchida, K., Kono, S., Konishi, K., Van Vleck, L. D., Suzuki, M. et Miyoshi S., 2000. Prediction of crude fat content of Longissimus muscle of beef using ratio of fat area calculated from computer image analysis: comparison of regression equations for prediction using different input devices at different stations. *J. Anim. Sci.*, 78, 799-803.
- Laroche M., 1992, Cooking. In Girard J.P. (Ed), Technology of meat and meat products, Chichester, England, 2, 32-82.
- Laroche M. et Salé P., 1976. Quelques aspects du comportement mécanique de protéines de tournesol filées. Influence de divers adjuvants et liants simples. *Ann. Technol. Agric.* 25, 143-158.
- Laurent, W., Bonny, J. M. et Renou, J. P., 2000. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chem.*, 69, 419-426.
- Laurent, W., 2000. Détermination des composants structurales du muscle par imagerie RMN à haut champ. Mise en correspondance avec l'image ultrasonore. Doctorat, Faculté de médecine, Clermont-Ferrand.
- Lepetit, J. et Culioli, J., 1992. Mechanical properties of meat. *Proceeding of IcoMST*, Clermont-Ferrand, France, 2, 39-42.
- Lepetit, J. et Buffiere, C., 1993. Comparaison de deux méthodes mécaniques de mesure de la résistance myofibrillaire de la viande crue. *Viande et produits carnés*, 14, 39-42.
- Lepetit, J. et Culioli, J., 1994. Mechanical properties of meat. *Meat Sci.*, 36, 203-237.
- Lewis, G. J., Purslow, P. P., et Rice, A. E., 1991. The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. *Meat Sci.*, 30, 1-12.
- Lewis, G. J. et Purslow, P. P., 1990. Connective tissue differences in the strength of cooked meat across the muscle fibre direction due to test specimen size. *Meat Sci.*, 28, 183-194.
- Li, J., Tan, J., Martz, F. A. et Heymann, H., 1999. Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Sci.*, 53, 17-22.
- Li, J., Tan, J. et Shatadal, P., 2001. Classification of tough and tender beef by image texture analysis. *Meat Sci.*, 57, 341-346.

- Light, N., Champion, A. E., Voyle, C. et Bailey, A. J., 1985. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. *Meat Sci.*, 13, 137-149.
- Light, N. D., 1987. The role of collagen in determining the texture of meat, *AVI Eds*, 4, 87-107.
- Likar, M. et Viergever, P., 2000. Retrospective shading correction based on entropy minimization. *J. Microscopy*, 197, 285-295.
- Listrat A., Picard, B. et Geay, Y., 1998. Age-related changes and localisation of type I, III, IV collagens during skeletal development of double-muscléd and normal bovine foetuses. *J. of Muscle Res. Cell Mot.*, 19, 1-14.
- Listrat, A., Lethias, C., Hocquette, J. F., Renand, G., Menissier, F., Geay, Y. et Picard, B., 2000. Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *Histochem. J.*, 32, 349-356.
- Liu, A., Nishimura, T. et Takahashi, K., 1994. Structural changes in endomysium and perimysium during *post-mortem* aging of chicken semitendinosus muscle - contribution of structural weakening of intramuscular connective tissue to meat tenderization. *Meat Sci.*, 38, 315-328.
- Liu, A., Nishimura, T. et Takahashi, K., 1995. Structural weakening of intramuscular connective tissue during *post mortem* ageing of chicken Semitendinosus muscle. *Meat Sci.*, 39, 135-142.
- Liu, A., Nishimura, T. et Takahashi, K., 1996. Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken muscles. *Meat Sci.*, 43, 43-49.
- Lopez De Leon, A. et Rojkind, M., 1985. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal Histochem. Cytochem.*, 33, 737-743.
- Lu, W. et Tan, J., 2004. Analysis of image-based measurements and USDA characteristics as predictors of beef lean yield. *Meat Sci.*, 66, 483-491.
- Martens, H., Stabursvik, E. et Martens, M., 1982. Texture and color changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscles proteins. *J. Text. Studies*, 13, 291-309.

Mathevon, E., Mioche, L., Brown, W. E. et Culioli, J., 1995. Texture analysis of beef cooked at various temperatures by mechanical measurements, sensory assessments and electromyography. *J. Text. Studies*, 26, 175-192.

Mathoniere, C., Mioche, L., Dransfield, E. et Culioli, J., 2000. Meat texture characterisation: comparison of chewing patterns, sensory and mechanical measures. *J. Text. Studies*, 31, 183-203.

Matsuyama, T., Miura, S., et Nagao, M., 1980. Structural analysis of natural textures by Fourier transformation. *CVGIP*, 24, 347-362.

Mc Clain, P. E., Miller, R. K., Savell, J. W., Cross, H. R. et Ringer, L. J., 1970. Effect of post mortem aging on isolation of intramuscular connective tissue. *J. Food Sci.*, 35, 258-259.

McCormick, R. J., 1994. The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Sci.*, 36, 79-91.

Mc Keith, F. K., De Vol, D. L., Miles, R. S., Bechtel, P. J. et Carr, T. L., 1985. Chemical and sensory properties of thirteen major beef muscles. *J. Food Sci.*, 50, 869-872.

Mery, D. et Pedreschi, F., 2005. Segmentation of colour food images using a robust algorithm. *J. Food Eng.*, 66, 353-360.

Miles, C. A., Fisher, A. V., Fursey, G. A. J. et Page, S. J., 1987. Estimating beef carcass composition using the speed of ultrasound. *Meat Sci.*, 21, 175-188.

Monin, G. et Ouali, A., 1991, Muscle differentiation and meat quality. In Lawrie, R Ed, Development in meat science - part 5, 3, 89-158, Elsevier applied science, Londres.

Monson, F., Sanudo, C. et Sierra, I., 2004. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Sci.*, 68, 595-602.

Nakajima, I., Yamaguchi, T., Ozutsumi, K. et Aso, H., 1998. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation*, 63, 193.

Nakamura, Y. N., Iwamoto, H., Ono, Y., Shiba, N., Nishimura, S. et Tabata, S., 2003. Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the M. Longissimus thoracis and M. Pectoralis profundus from pigs. *Meat Sci.*, 64, 43-50.

Newman, P. B., 1984. The use of video image analysis for quantitative measurement of fatness in meat: Part 2--Comparison of VIA, visual assessment and total chemical fat estimation in a commercial environment. *Meat Sci.*, 10, 161-166.

Niblack, W., An introduction to digital image processing. 1985, Prentice-Hall International Eds, Englewood Cliffs, New Jersey.

- Nishimura, T., Hattori, A. et Takahashi, K., 1995. Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Sci.*, 39, 127-133.
- Nishimura, T., Hattori, A. et Takahashi, K., 1996. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of intramuscular connective tissue during *post mortem* ageing of beef. *Meat Sci.*, 42, 251-260.
- Nishimura, T., Liu, A., Hattori, A., et Takahashi, A., 1998. Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *J. Anim. Sci.*, 76, 528-532.
- Nishimura, T., Hattori, A. et Takahashi, K., 1999. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese Black cattle: Effect of marbling on beef tenderization. *J. Anim. Sci.*, 77, 93-104.
- Nishiumi, T., 1999, Intramuscular connective tissue: its relation to meat texture and postmortem alterations. In Nishiumi, T. Ed, Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry, 3, 159-179.
- Nishiyama, T., McDonough, A., Bruns, R. et Burgeson, R., 1994. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J. Biol. Chem.*, 269, 28193-28199.
- Norman, G. A., 1982. Effects of breed and nutrition on the productive traits of beef cattle in South-East Brazil: part 3-Meat quality. *Meat Sci.* , 6, 7-86.
- Offer, G., Knight, P., Jeacocke, R., Almond, R., Cousins, T., Elsey, J., Parsons, N., Sharp, A., Starr, R. et Purslow, P., 1989. The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products. *Food Microstructure*, 8, 151-170.
- Otsu, N., 1979. A threshold selection method from gray level histograms. *IEEE Trans. Systems, Man and Cybernetics*, 9, 62-66.
- Perkins, T. L., Green, R. D., et Hamlin, K. E., 1992. Evaluation of ultrasonic estimates of carcass fat thickness and *Longissimus* muscle area in beef cattle. *J. Anim Sci.*, 70, 1002-1010.
- Piec, I, 2005. Etude protéomique du vieillissement du muscle squelettique chez le rat LOU/c/Jall. Doctorat, Faculté de médecine, Clermont-Ferrand.
- Purchas, R. W., 1990. An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci.*, 27, 129-140.
- Purslow, P. P., 1985. The physical basis of meat texture: observations on the fracture behaviour of cooked bovine *M. Semitendinosus*. *Meat Sci.*, 12, 39-60.

- Purslow, P. P. et Trotter, J. A., 1994. The morphology and mechanical properties of endomysium in series-fibred muscles: variations with muscle length. *J Muscle Res Cell Motil*, 15, 299-308.
- Purslow, P. P., 1999. The intramuscular connective tissue matrix and cell/matrix interaction in relation to meat toughness. *Proceeding of 45th ICoMST*, Yokohama, Japon, 1, 210-219.
- Purslow, P. P., 2002. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133, 947-966.
- Purslow, P. P., 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality - a review. *Meat Sci.*, *In Press*, *Corrected Proof*.
- Ramsbottom, J. M., Strandine, E. J. et Koonz, C. H., 1945. Comparative tenderness of representative beef muscles. *Food Research*, 10, 497-509.
- Reagan, J. D., Carpenter, Z. L. et Smith, G. C., 1976. Age related traits affecting the tenderness of bovine *Longissimus dorsi*. *J. Anim. Sci.*, 43, 1198-2204.
- Rhee, M. S., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. et Koohmaraie, M., 2004. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *J. Anim Sci.*, 82, 534-550.
- Rosin, P. L., 2001. Unimodal thresholding. *Pattern Recog.*, 34, 2083-2096.
- Ross, R. et Bornstein, P., 1969. The elastic fiber: I. The Separation and Partial Characterization of its Macromolecular Components. *J. Cell Biol.*, 40, 366-381.
- Rowe, R. W. D., 1974. Collagen fibre arrangement in intramuscular connective tissue. Changes associated with muscle shortening and their possible relevance to raw meat toughness. *J. Food Technol.*, 9, 501-508.
- Rowe, R. W. D., 1977. The influence of the collagen fibre network of muscle on the compliance and tensile strength of muscle samples subjected to loads at right angles to the fibre axis. *Meat Sci.*, 1, 135-148.
- Rowe, R. W. D., 1978. Collagen fibrils of the perimysium and endomysium of sheep *semitendinosus* muscle. *Meat Sci.*, 2, 275-280.
- Rowe, R. W. D., 1986. Elastin in bovine *Semitendinosus* and *Longissimus dorsi* muscles. *Meat Sci.*, 17, 293-312.
- Saber E., Tekalp A. M., Eschbach R. et Knox K., 1996. Automatic Image Annotation Using Adaptive Color Classification. *Graph. Models Image Proc.*, 58, 115-126.

- Salari, E. et Ling, Z., 1995. Texture segmentation using hierarchical wavelet decomposition. *Pattern Recog.*, 28, 1819-1824.
- Sale, P., 1980. Que peut-on attendre des méthodes instrumentales d'évaluation de la tendreté de la viande? *Bulletin technique de la CRZV Theix-INRA*, 40, 19-26.
- Sankur, B. et Sezgin, M., 2001. Image thresholding techniques: a survey over categories. *Pattern recog.*
- Sanudo, C., Macie, E. S., Olleta, J. L., Villarroel, M., Panea, B. et Alberti, P., 2004. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.*, 66, 925-932.
- Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yoriuzzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N. et Nagata, K., 2002. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J. Biol. Chem.*, 277, 37678-37684.
- Schmitt, O. et Dumont, B. L., 1969. Méthodes d'analyse de la structure musculaire. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 9, 123-134.
- Schmitt, O. et Dumont, B. L., 1972. Conjonctif et croissance musculaire. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 12, 667-672.
- Schmitt, O., Degas, T., Perot, P., Langlois, M. R. et Dumont, B. L., 1979. Etude morpho-anatomique du pérимыsium (méthodes de description et d'évaluation). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19, 1-30.
- Scott, J. E., 1980. Collagen--proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem J*, 187, 887-891.
- Scott, J. E., 1996. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*, 35, 8795-9.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. et Koohmaraie, M., 1995. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J. Anim Sci.*, 73, 3333-3340.
- Shiranita, K., Miyajima, T. et Takiyama, R., 1998. Determination of meat quality by texture analysis. *Pattern Recog. Lett.*, 19, 1319-1324.
- Silva, J. A., Patarata, L. et Martins, C., 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.*, 52, 453-459.

Skjervold, P. O., Taylor, R. G., Wold, J. P., Berge, P., Abouelkaram, S., Culioli, J. et Dufour, E., 2003. Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue, and myofibers in meat. *J Food Sci*, 68, 1161-1168.

Sorland, G. H., Larsen, P. M., Lundby, F., Rudi, A.-P., et Guiheneuf, T., 2004. Determination of total fat and moisture content in meat using low field NMR. *Meat Sci.*, 66, 543-550.

Stanton, C. et Light, N., 1987. The effects of conditioning on meat collagen: Part 1--Evidence for gross in situ proteolysis. *Meat Sci.*, 21, 249-265.

Strandine, E. J., Koonz, C. H. et Ramsbottom, J. M., 1949. A study of variations in muscles of beef and chicken. *J. Anim. Sci.*, 4, 483-494.

Suzuki, A., Ueno Y. et Ikeuchi Y., 1998. Effects of high hydrostatic on intramuscular connective tissue. *Proceeding of 44th ICoMST*, Barcelona, Espagne, 2, 554-555.

Tahara, K., Aso, H., Yamaguchi, T., Yamasaki, T., Takano, S., Rose, M. T., Takasuga, A. et Sugimoto, Y., 2004. Cloning and expression of type XII collagen isoforms during bovine adipogenesis. *Differentiation*, 72, 113-122.

Tan, J., 2004. Meat quality evaluation by computer vision. *Journal of Food Engineering*, 61, 27-35.

Taylor, R. G., 2004, Connective tissue structure, function and influence on meat quality. In *Encyclopedia of meat science* Eds, 306-313.

Tono-Oka, S., Tanase, S., Miike, T. et Tanaka, H., 1996. Transient expression of collagen type XIV during muscle development and its reappearance after denervation and degeneration. *J. Histochem. Cytochem.*, 44, 907-918.

Torrescano, G., Lujan, L., Sanchez-Escalante, A., Gimenez, B., Roncales, P. et Beltran, J. A., 2001. Determination of *perimysium* and *endomysium* thickness in bovine, ovine, caprine, *Semimembranosus* and *Semitendinosus* muscles by video image analysis. *47th ICoMST*, Crakovie, Pologne, 3, 236-237.

Torrescano, G., Sanchez-Escalante, A., Gimenez, B., Roncales, P. et Beltran, J. A., 2003. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Sci.*, 64, 85-91.

Totland, G. K., Kryvi, H. et Slinde, E., 1988. Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine *M. semitendinosus* and its relation to tenderness. *Meat Sci.*, 23, 303-315.

Tsai, D.-M., 1995. A fast thresholding selection procedure for multimodal and unimodal histograms. *Pattern Recog. Lett*, 16, 653-666.

- Tume, R. K., 2004. The effects of environmental factors on fatty acid composition and the assessment of marbling in beef cattle: a review. *Aus J. Exp. Agric.*, 44, 663-668.
- Van der Rest, M. et Garrone, R., 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, 2814-2823.
- Van der Rest M. et Dublet B., 1996. Type XII and type XIV collagens: interfibrillar constituents of dense connective tissues. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 7, 639-648.
- Viidik, A., Danielson, C. C. et Oxlund, H., 1982. On fundamental and phenomenological models, structure and mechanical properties of collagen, elastin and glycosaminoglycan complexes. *Biorheology*, 19, 437-51.
- Vogel, K. G., Paulsson, M. et Heinegard, D., 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*, 223, 587-97.
- Vrhovski, B. et Weiss, A. S., 1998. Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.*, 258, 1-18.
- Wheeler, T. L. et Koohmaraie, M., 1994. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *J. Anim Sci.*, 72, 1232-1238.
- Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. et Koohmaraie, M., 2000. Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. *J. Anim. Sci.*, 78, 958-965.
- Yablonskiy, D. A. et Haacke, E. M., 1994. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. *Magn Reson Med*, 32, 749-63.
- Young, O. A., Braggins, T. J. et Barker, G. J., 1992. The effects of collagen characteristics on sensory assessment and shear values of cooked sheep Semimembranosus. *Proceeding of 38th ICoMST*, Clermont-Ferrand, France, 3, 455-458.
- Young, O. A. et Braggins, T. J., 1993a. Tenderness of ovine semimembranosus - Is collagen concentration or solubility the critical factor? *Meat Sci.*, 35, 213-222.
- Young, O. A., Hogg, B. W., Mortimer, B. J. et Waller, J. E., 1993b. Collagen in two muscles of sheep selected for weight as yearlings. *N. Z. J. Agric. Res.*, 36, 143-150.
- Zhang, Y. J., 1997. Evaluation and comparison of different segmentation algorithms. *Pattern Recog. Lett.*, 18, 963-974.

LISTE DES COMMUNICATIONS DES TRAVAUX

• Communications orales

Optimisation of high resolution MR imaging of structure at 4.7T. JM Bonny, L Maunier, JP Renou. 2001, conférence Heidelberg, Nottingham

Image analysis for characterization of the intramuscular connective tissue in meat. L Sifre Maunier, R Taylor, P Berge, J.M Bonny, 2004. 50th ICoMST, Helsinki.

• Posters

Etude histologique des composants de la trame périmysiale des muscles de bovins. Traitement d'images et comparaison avec les méthodes d'imagerie IRM. R Labas, J.M Bonny, L Chanier, L Maunier et R Taylor 2001. Congrès de l'Association Française d'Histotechnologie, La Rochelle.

Caractérisation de l'organisation du perimysium dans le muscle par différentes méthodes. R Labas, L Maunier, L Chanier, J.M Bonny, P Berge et R Taylor 2002. 11^{ème} Congrès Annuel de la Société Française du Tissu Conjonctif, Nantes.

Quantification de l'organisation du réseau conjonctif périmysial du muscle de bovin. L Maunier, L Chanier, R Labas, R Taylor, A Listrat, J Culioli. Viandes et Produits Carnés, 2002, vol. 22, G-POS15.

Etude histologique des viandes déstructurées de porcs. Comparaison entre un modèle expérimental et des jambons industriels. R Labas, L Chanier, C Garrido, L Maunier, R Taylor, T Astruc, E Laville. Viandes et Produits Carnés, 2002, vol. 22, G-POS12.

Lipid and connective tissue organisation in bovine muscles. L Sifre Maunier, J Culioli, R Labas, R Taylor, A Listrat, 2004. XIXth Fects Meeting, 2004, Taormina - Giardini Naxos, Italie.

Caractérisation de l'organisation du tissu conjonctif intramusculaire de la viande bovine. L Sifre Maunier, R Taylor, P Berge, J-M Bonny, 2004. 10^{ème} journées des sciences du muscle et des technologies de la viande, 2004, Rennes.

Diffusion de l'eau dans la viande. J-M Bonny, L Maunier, J-P Renou, 2004. 10^{ème} journées des sciences du muscle et des technologies de la viande, 2004, Rennes.

Etudes immunohistologiques de la trame conjonctive de muscles de bovins en relation avec la tendreté. R Labas, L Sifre Maunier, L Chanier, A Listrat, R Taylor, 2004. 10^{ème} Journées des sciences du muscle et technologies de la viande, 2004, Rennes.

- **Articles**

A global unimodal thresholding based on probabilistic reference maps for the segmentation of muscle images. L. Sifre-Maunier, R. G. Taylor, P. Berge, J. Culioli, J-M Bonny, Image and Vision Computing en correction.

Influence of perimysium spatial organization on beef tenderness. L. Sifre, P. Berge, E. Engel, J.F. Martin, J.M. Bonny, A. Listrat, R. G. Taylor, J. Culioli., Journal of agricultural food chemistry, 53 (21):8390-8399, 2005.

ORGANISATION SPATIALE DU TISSU CONJONCTIF INTRAMUSCULAIRE : RELATION AVEC LA TEXTURE DE LA VIANDE BOVINE.

Les propriétés du périmysium (90% du tissu conjonctif intramusculaire) telles que sa proportion dans le muscle et la stabilité thermique de ses constituants (collagène principalement), ont fait l'objet de nombreuses études, mais n'ont permis d'expliquer que partiellement les variations de la tendreté de la viande. L'organisation spatiale du tissu conjonctif, quant à elle, n'a fait l'objet que de rares travaux dont la portée a été limitée par la méthode d'imagerie employée (microscopie). Ces travaux ont cependant permis de formuler des hypothèses susceptibles aujourd'hui d'être explorées à l'aide de techniques objectives, comme l'analyse d'images mettant en œuvre des algorithmes automatiques.

Dans la présente étude, le périmysium a été analysée sur le muscle frais, à l'aide de deux modalités d'imagerie, l'histologie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'histologie a, en effet, permis l'observation des faisceaux primaires, regroupant des fibres musculaires et l'IRM, la caractérisation des faisceaux d'ordre supérieur, regroupant plusieurs faisceaux primaires. Pour ces deux modalités, une méthode de seuillage du périmysium a été mise au point et validée avec la construction d'une banque de cartes de référence probabilistes, résultat de la segmentation manuelle du réseau par un jury d'experts.

Le réseau de périmysium ainsi segmenté a été caractérisé à l'aide de variables morpho-anatomiques (surface, longueur et épaisseur) et de variables granulométriques. Celles-ci ont été ensuite reliées à la résistance mécanique et à la tendreté sensorielle de la viande cuite. Ce sont les structures macroscopiques, visualisées en IRM, dont le rayon est compris entre 0,7 et 1,2 mm, qui jouent un rôle majeur sur le déterminisme de la tendreté de la viande bovine cuite. Ces résultats ouvrent des perspectives pour le développement de méthodes d'imagerie simples adaptées à la prédiction et au contrôle de la tendreté de la viande bovine.

MOTS-CLEFS

Muscle, tendreté, périmysium, histologie, immuno-histologie, imagerie par résonance magnétique nucléaire, analyse d'images, segmentation, cartes probabilistes de référence.

SPATIAL ORGANISATION OF INTRAMUSCULAR CONNECTIVE TISSUE: RELATION WITH BOVINE MEAT TEXTURE.

The properties of the perimysium (90% of the intramuscular connective tissue), such as content and heat stability have focused the interest of many studies, they explained only a part of the meat tenderness variability. A few works studied the spatial organisation of connective tissue but they were limited by the imagery modality used (microscopy). However these studies suggested hypotheses that can now be explored with objective techniques, like image analysis using automatic algorithms.

In this study, the perimysium was analysed by two modalities of imagery (histology and magnetic resonance imaging (MRI)). Histology revealed primary fascicles, grouping muscle fibers, whereas MRI visualised larger fascicles, grouping several primary fascicles. For these two modalities, a thresholding method was set up and validated using probabilistic reference maps, resulting from the manual segmentation by a panel of experts.

The perimysium network was characterised with morpho-anatomical variables (area, length and thickness) and granulometry variables. They were then related to mechanical measurements and sensory tenderness. Macroscopical structures, visualised by MRI, play a major role in determining the toughness of cooked beef. These results open further prospects for the development of on-line imagery methods adapted for prediction and monitoring of beef tenderness.

KEYWORDS:

Muscle, tenderness, perimysium, histology, immuno-histology, nuclear magnetic resonance imaging, image analysis, segmentation, probabilistic reference maps.